

Université de Montréal

**Contrôle pharmacologique de l'apoptose cardiovasculaire dans
l'hypertension : Implication de la voie de l'angiotensine et de la correction
de la dysfonction endothéliale.**

Par

Shant Der Sarkissian

**Département de Pharmacologie
Faculté de Médecine**

**Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Pharmacologie**

Avril 2003

©Shant Der Sarkissian, 2003



W
4
U58
2003
v. 113

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Contrôle pharmacologique de l'apoptose cardiovasculaire dans
l'hypertension : Implication de la voie de l'angiotensine et de la correction
de la dysfonction endothéliale.

Par

Shant Der Sarkissian

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

André deLéan
président-rapporteur
Denis deBlois
directeur de recherche
Rhian Touyz
Membre du jury
Jacques Couet
examineur externe

représentant du doyen de la FES

Sommaire

Les antihypertenseurs ont non seulement le pouvoir de réduire la pression artérielle mais aussi de corriger les altérations maladaptées de la structure cardiovasculaire. Ces agents peuvent normaliser l'hypertrophie qui représente une condition pathologique de l'hypertension. Notre laboratoire a été le premier à démontrer que les inhibiteurs de la voie de l'angiotensine stimulent l'apoptose durant la phase précoce de la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire chez le SHR indépendamment de la régulation de la pression. L'objectif général de cette thèse consiste à évaluer les sous-types cellulaires impliqués dans cette réponse apoptotique ainsi que la contribution des récepteurs à l'angiotensine et la correction de la dysfonction endothéliale. Nous avons démontré que les antagonistes AT_1 et les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (iECA) renversent l'hyperplasie des non-cardiomyocytes par apoptose sélective des fibroblastes interstitiels et stimulent l'apoptose des cellules mésothéliales de l'épicarde au cours de la régression de l'hypertrophie cardiaque. Cependant, l'apoptose est induite plus tôt avec l'antagoniste AT_1 (à 1 semaine) qu'avec l'iECA (à 2 semaines) suggérant l'implication de mécanismes distincts. Nous avons démontré l'implication du récepteur pro-apoptotique AT_2 dans la réponse apoptotique sélective pour les cardiocytes durant le traitement avec l'antagoniste AT_1 mais non avec l'iECA. D'autre part, considérant l'association entre l'augmentation de l'activité fonctionnelle de l'endothélium et la régression de l'hypertrophie, nous avons démontré une implication de la correction de la dysfonction endothéliale ainsi que son effet synergique dans l'induction de l'apoptose des cellules du muscle lisse de l'aorte lors du traitement avec les iECA. L'hyperplasie cellulaire associée à la pathophysiologie de l'hypertension apparaît dorénavant réversible grâce à la découverte de l'apoptose cellule-spécifique suite au traitement *in vivo* avec les inhibiteurs de la voie de l'angiotensine. L'élucidation des voies moléculaires impliquées et la démonstration d'un effet potentialisateur pro-apoptotique de la restauration de la fonction endothéliale permet l'avancement des connaissances dans le traitement des maladies cardiovasculaires.

Mots clés : Apoptose, dysfonction endothéliale, récepteurs (AT_1 et AT_2) de l'angiotensine II, inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, antagonistes AT_1 , remodelage cardiovasculaire, hypertrophie, hypertension artérielle.

Summary

In addition to high blood pressure reduction, antihypertensive drugs possess the ability to correct pathological alterations in cardiovascular structure. Our laboratory was the first to demonstrate that angiotensin pathway inhibitors stimulate apoptosis during the onset of cardiovascular hypertrophy regression in the SHR, independently of blood pressure normalization. The main objective of this thesis is to study the cell selectivity of this apoptotic response, to evaluate the contribution of angiotensin receptors subtypes and the restoration of endothelial function in this effect. We demonstrated that angiotensin AT₁ receptor antagonists and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors are equipotent in reversing non-cardiomyocyte hyperplasia by selectively inducing apoptosis in interstitial fibroblasts, as well as increasing apoptosis in epicardial mesothelial cells during the regression of cardiac hypertrophy. However, AT₁ antagonists stimulate these effects significantly earlier (at 1 week) than ACE inhibitors (at 2 weeks) suggesting the implication of distinct mechanisms. We demonstrated the implication of the pro-apoptotic AT₂ receptor in the cardiocyte-selective apoptotic response during AT₁ receptor antagonist treatment but not during ACE inhibition. Considering the causality between the increase in endothelial functionality and the regression of hypertrophy, we demonstrated the implication of the correction of endothelial dysfunction as well as its synergistic action on smooth muscle cell apoptosis induction in the SHR aorta during ACE inhibitor treatment. Cellular hyperplasia associated with hypertensive pathophysiology can no longer be considered as an irreversible process due to the discovery of cell type-selective apoptosis stimulation during *in vivo* angiotensin pathway inhibitor treatment. Defining the molecular pathways implicated and the demonstration of a potentiated pro-apoptotic effect following restoration of endothelial function may have important implications in cardiovascular disease intervention.

Keywords: Apoptosis, endothelial dysfunction, angiotensin II (AT₁ and AT₂) receptor subtypes, ACE inhibitors, AT₁ antagonists, cardiovascular remodeling, hypertrophy, hypertension.

Table des matières

	Page
Sommaire en français	I
Sommaire en anglais	II
Table des matières	III
Liste des Tableaux	X
Liste des Figures	X
Liste des abréviations	XI
Dédicace	XIII
Remerciements	XIV

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

1.1. HYPERTENSION ARTÉRIELLE	1
1.1.1. Données cliniques et épidémiologiques	2
1.1.2. Mécanismes de contrôle de la pression	3
1.1.2.1. Hémodynamie	3
1.1.2.2. Système nerveux central et autonome	3
1.1.2.3. Facteurs humoraux	5
1.1.2.3.1. Système rénine-angiotensine	6
1.1.2.3.2. Endothéline	7
1.1.3. Pathophysiologie de l'hypertension artérielle	8
1.1.4. Complications associées à l'hypertension artérielle	10
1.1.4.1. Dommages aux organes cibles	11
1.1.4.2. Dysfonction endothéliale	11
1.1.5. Traitement de l'hypertension artérielle	13
1.1.5.1. But et approches	14

1.1.5.2. Traitement pharmacologique	15
1.1.5.2.1. Classes d'agents antihypertenseurs	16
1.1.5.2.2. Nouvelles classes	19
1.1.5.2.3. Suppléments	20
1.1.5.3. Traitement non-pharmacologique	22
1.1.5.4. Thérapie génique	22
1.1.6. Modèles expérimentaux d'hypertension artérielle	23
1.1.6.1. Le rat spontanément hypertendu	24
1.2. REMODELAGE CARDIOVASCULAIRE DANS L'HYPERTENSION	26
1.2.1. Le coeur	26
1.2.1.1. Structure cardiaque	26
1.2.1.2. Pathophysiologie dans l'hypertension	27
1.2.1.3. Remodelage cardiaque	30
1.2.1.3.1. Implication des cardiomyocytes	32
1.2.1.3.2. Implication des non-cardiomyocytes	33
1.2.1.3.3. Altération de la microcirculation coronarienne	36
1.2.2. Le système vasculaire	37
1.2.2.1. Structure vasculaire	37
1.2.2.2. Pathophysiologie dans l'hypertension	37
1.2.2.3. Remodelage vasculaire	38
1.2.2.3.1. Remodelage hypertrophique (grosses artères)	39

1.2.2.3.2. Remodelage eutrophique (petites artères)	41
1.2.2.3.3. Implication des espèces réactives d'oxygène	42
1.2.3. Pharmacothérapie du remodelage	43
1.2.3.1. Effets cardiaque	43
1.2.3.2. Effets vasculaires	46
1.2.3.2.1. Correction de la dysfonction endothéliale	48
1.3. ANGIOTENSINE II DANS LE SYSTÈME CARDIOVASCULAIRE	49
1.3.1. Biosynthèse d'angiotensine II	49
1.3.1.1. Systèmes tissulaires et voies alternatives de synthèse	49
1.3.2. Types de récepteurs associés et distribution tissulaire	50
1.3.2.1. Les récepteurs AT ₁	51
1.3.2.2. Les récepteurs AT ₂	52
1.3.3. Effets physiologiques de l'angiotensine II	53
1.3.4. Effets moléculaires et cellulaires de l'angiotensine II	54
1.3.4.1. Effets sur la croissance cellulaire	54
1.3.4.2. Effets sur la mort cellulaire	56
1.3.4.3. Régulation de la survie selon le type cellulaire	58
1.3.4.4. Effets sur la matrice extracellulaire	60
1.3.4.5. Effets sur la contractilité vasculaire	60
1.3.4.6. Effets sur l'endothélium	61
1.3.4.6.1. Métabolisme de l'oxygène	62
1.3.4.6.2. Stress oxydatif	62

1.3.4.6.3. Survie cellulaire	63
1.3.4.6.4. Tonus vasculaire	65
1.3.4.6.5. Effets pathophysiologiques	65
1.3.5. Applications cliniques du blocage du SRA	66
1.4. APOPTOSE: DÉFINITION ET IMPLICATIONS THÉRAPEUTIQUES	67
1.4.1. Définition, critères morphologies, biochimiques et biocascade	68
1.4.1.1. Description	68
1.4.1.2. Critères morphologiques	70
1.4.1.3. Critères biochimiques	71
1.4.1.4. Apoptose versus nécrose	72
1.4.1.5. Biocascades cellulaires de l'apoptose : la phase d'initiation	74
1.4.1.5.1. Voie associée aux récepteurs de mort	74
1.4.1.5.2. Voie mitochondriale	75
1.4.1.6. Activation des caspases : la phase d'exécution	76
1.4.1.7. L'inhibition de l'apoptose: la phase de contrôle	78
1.4.1.7.1. Inhibiteurs généraux de caspases	79
1.4.1.8. La fragmentation de l'ADN: la phase de dégradation	80
1.4.2. Méthodes pour évaluer l'apoptose	81
1.4.2.1. Méthodes morphologiques	82
1.4.2.2. Méthodes basées sur le marquage de l'ADN fragmenté	82
1.4.2.3. Méthodes basées sur la détection de protéines apoptotiques	83

1.4.3. Potentiel thérapeutique de la modulation de l'apoptose	83
1.4.3.1. L'apoptose et l'hypertension	84
1.5. OBJECTIFS GÉNÉRAUX DE LA THÈSE	86
 CHAPITRE 2: REVERSAL OF INTERSTITIAL FIBROBLAST HYPERPLASIA VIA APOPTOSIS IN HYPERTENSIVE RAT HEART WITH VALSARTAN OR ENALAPRIL	
2.1. ABSTRACT	89
2.2. INTRODUCTION	90
2.3. METHODS	92
Animal procedures	
Hypertrophy and hyperplasia measurements	
DEVDase activity	
Expression of apoptosis regulatory proteins	
Immunohistochemistry	
Statistical analysis	
2.4 RESULTS	96
2.5. DISCUSSION	99
2.6. REFERENCES	103
2.7. FIGURE LEGENDS, TABLE AND FIGURES	109
 CHAPITRE 3: ROLE OF ANGIOTENSIN II TYPE 2 RECEPTORS DURING REGRESSION OF CARDIAC HYPERTROPHY IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS	
3.1. ABSTRACT	117
3.2. INTRODUCTION	118
3.3. METHODS	119
Animal procedures	
Analysis of apoptosis	

	Hypertrophy and hyperplasia measurements	
	Statistical analysis	
3.4	RESULTS	121
	Study with valsartan	
	Study with enalapril	
3.5.	DISCUSSION	124
3.6.	REFERENCES	128
3.7.	FIGURE LEGENDS AND FIGURES	134
 CHAPITRE 4: SYNERGISTIC INTERACTION BETWEEN ENALAPRIL, L-ARGININE AND TETRAHYDROBIOPTERIN IN SMOOTH MUSCLE CELL APOPTOSIS AND AORTIC REMODELING INDUCTION IN SHR		
4.1.	ABSTRACT	144
4.2.	INTRODUCTION	145
4.3.	METHODS	146
	Animal procedures	
	Vasoreactivity	
	Histology	
	Statistical analysis	
4.4	RESULTS	149
	Enalapril time course study	
	L-arginine + BH ₄ combination therapy study	
4.5.	DISCUSSION	152
4.6.	REFERENCES	157
4.7.	FIGURE LEGENDS AND FIGURES	163

CHAPITRE 5: DISCUSSION

5.1. SÉLECTION DU MODÈLE	171
5.2. OBJECTIF 1	172
5.2.1. Susceptibilité d'une sous-population cellulaire à l'apoptose	174
5.2.1.1. Myofibroblastes et cellules mésothéliales	174
5.2.1.2. Cellules polyploïdes	177
5.2.2. Susceptibilité à l'apoptose selon l'environnement	178
5.2.2.1. Rôle de la matrice extracellulaire	179
5.2.3. Effets bénéfiques spécifiques au type cellulaire des bloqueurs du SRA	180
5.3. OBJECTIF 2	182
5.4. OBJECTIF 3	186
5.5. PERSPECTIVES ET DIRECTIONS FUTURES	190
5.5.1. Sous-populations cellulaires apoptotiques	185
5.5.2. Contrôle de la fibrose	191
5.5.3. Induction de l'apoptose par le récepteur AT ₂	193
5.6. IMPLICATIONS CLINIQUES	195
5.6.1. Effets bénéfiques des antagonistes du SRA, nouveaux concepts d'utilisation et considérations cliniques	195
5.7. CONCLUSION	200
BIBLIOGRAPHIE	201
ANNEXE	251
LISTE DE PUBLICATIONS	

Liste des Tableaux

Tableau I	Effets physiologiques de l'AngII via les récepteurs AT ₁ et AT ₂ .	53
Tableau II	Rôle du récepteur AT ₁ selon les types cellulaires sur la croissance et l'apoptose du système cardiovasculaire et les conséquences structurales.	58
Tableau III	Rôle du récepteur AT ₂ selon les types cellulaires sur la croissance et l'apoptose du système cardiovasculaire et les conséquences structurales.	59
Tableau IV	Comparaison entre la mort cellulaire par apoptose et par nécrose.	74
Tableau V	Résumé des molécules pro-apoptotiques et leur contrepartie anti-apoptotiques lorsque applicable.	81
Tableau VI	Études randomisées avec les bloqueurs du SRA.	196

Liste des Figures

Figure 1	Schéma du système rénine-angiotensine.	7
Figure 2	Sites d'action des classes majeures d'agents antihypertenseurs.	15
Figure 3	Représentation des types d'hypertrophie cardiaque dans l'hypertension	29
Figure 4	Balance croissance/apoptose cellulaire dans endothélium normal et dysfonctionnel.	65
Figure 5	Modulation de l'équilibre prolifération/apoptose cellulaires et les répercussions au niveau de la structure tissulaire.	69
Figure 6	Schématisation des différences morphologiques : apoptose vs nécrose.	73
Figure 7	Schéma récapitulatif des voies apoptotiques.	77
Figure 8	Représentation schématique de la régulation d'ordre temporel et spécifique au type cellulaire de l'apoptose induit par les bloqueurs du SRA.	182
Figure 9	Comparaison entre les actions pharmacologiques potentielles des antagonistes AT ₁ et des iECA et des voies moléculaires impliquées.	185
Figure 10	Représentation schématique de l'hypothèse de l'effet thérapeutique de l'énalapril sur la structure vasculaire.	188

Liste des abréviations

AngI	Angiotensine I (décapeptide)
AngII	Angiotensine II (octapeptide)
AngIII	Angiotensine III (fragment 1-7)
AngIV	Angiotensine IV (fragment 3-7)
ANP	Atrial natriuretic peptide
AVC	Accident vasculaire cérébral
AT ₁	Sous-type AT ₁ des récepteurs de l'AngII
AT ₂	Sous-type AT ₁ des récepteurs de l'AngII
AVP	Vasopressine
BH ₄	Tetrahydrobiopterine
BK	Bradykinine
CAD	Caspase-activated DNase
CAGE	Chymostatin-sensitive angiotensin II generating enzyme
CDK	Cyclin-dependant kinase
CML	Cellule musculaire lisse
CrmA	Cytokine response modifier A
DFF	DNA fragmentation factor
DOCA-sel	Deoxycorticosterone acetate-salt
ECA	Enzyme de conversion de l'AngI
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
ET	Endothéline
GSH	Glutathion réduit
HO·	Radical hydroxyl
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HOCl	Acide hypochloreux
ICAD	Inhibitor of caspase-activated DNase
iECA	Inhibiteur de l'ECA
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MMP	Matrix metalloproteinase
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NEP	Neuronal endopeptidase
NO	Monoxyde d'azote
O ₂ -	Superoxyde
ONOO-	Peroxynitrite
PL	Phospholipase
ROS	Reactive oxygen species
SHM	Spontaneously hypertensive mouse
SHR	Spontaneously hypertensive rat
SHR-SP	Stroke prone SHR
SNA	Système nerveux autonome
SNC	Système nerveux central

SNS	Système nerveux sympathique
SOD	Superoxyde dismutase
SRA	Système rénine-angiotensine
tdt	Terminal deoxynucleotidyl transférase
TNF	Tumor necrosis factor
tPA	Tissue plasminogen activator
TUNEL	Tdt-mediated dUTP nick-end labeling
VWF	Von Willebrand Factor
WKY	Wistar-Kyoto rat
XO	Xanthine oxydase

*À la mémoire de
ma grand-mère bien aimée
Sirane Der Sarkissian*

Remerciements

Avant tout, j'aimerais remercier mes parents qui m'ont inculqué le courage, la confiance et la détermination, des attributs qui me serviront tout au long de mon chemin vers ma quête personnelle d'excellence. Cet ouvrage est un reflet de leurs innombrables efforts. J'aimerais remercier tous les membres de ma famille pour leur compréhension et leurs encouragements. Un merci très spécial à Eve-Lyne Marchand pour son support continu et pour m'avoir appris à faire confiance à mes talents.

Je désire exprimer mon appréciation à ceux qui ont collaboré à ce projet de doctorat et à tous ceux qui ont contribué à ma formation en général au cours de mes études graduées, particulièrement les Drs. Pavel Hamet, Johanne Tremblay, Sergei Orlov, Rhian Touyz et Patrick du Souich.

Finalement, ma sincère appréciation et ma gratitude sont réservées à mon directeur de thèse, Dr. Denis deBlois, qui par ses conseils et son originalité a contribué à la réalisation de ce projet. Il a cru en mon potentiel et a su transmettre sa vision scientifique. Je le remercie aussi pour sa précieuse amitié.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

La première partie de l'introduction fera un survol de l'hypertension artérielle, les données cliniques et épidémiologiques, les principaux mécanismes de contrôle de la pression, la pathophysiologie, la pharmacologie ainsi que les modèles expérimentaux. La seconde section abordera le remodelage cardiovasculaire associé à l'hypertension artérielle ainsi que la pharmacologie du remodelage thérapeutique. La troisième section sera concentrée sur les aspects cellulaires et sous-cellulaires du système rénine-angiotensine. Finalement, un survol du processus apoptotique ainsi que son potentiel thérapeutique dans l'hypertension sera fait avant d'aborder les résultats et la discussion générale de la thèse.

1.1. HYPERTENSION ARTÉRIELLE

En 1896, pour la première fois Riva-Rocci décrivait un brassard pneumatique permettant la mesure brachiale de la pression sanguine à l'aide d'un stéthoscope. Cette percée technologique a depuis permis d'identifier l'*hypertension* en tant que facteur de risque en y associant les changements cardiovasculaires morbides observés.

Aujourd'hui avec les énormes efforts investis en recherche pharmaceutique, clinique et fondamentale, le développement de nouvelles approches scientifiques et les démarches innovatrices au laboratoire, l'objectif ultime est convoité : le contrôle de l'hypertension, la correction des dommages aux organes-cibles et l'élimination des conséquences fatales de la morbidité.

1.1.1. Données cliniques et épidémiologiques

L'hypertension artérielle est définie comme une tension artérielle (systolique et/ou diastolique) supérieure à 140 / 90 mmHg. Cette élévation de la pression sanguine est perçue par l'augmentation du tonus vasculaire périphérique, menant à la résistance artériolaire et à la réduction de la capacitance des veinules. L'hypertension entraîne des dommages aux organes vitaux qui sont soumis en permanence à cette élévation chronique de la pression. Elle représente un facteur de risque majeur pour le développement des maladies vasculaires, cardiaques, cérébrales et rénales.¹

L'hypertension et les maladies cardiovasculaires connexes représentent un fardeau global. La maladie cardiaque ischémique et les troubles cardiovasculaires se positionnent en quatrième et cinquième position respectivement parmi les dix principales causes de mortalité à l'échelle mondiale. Au Canada, le pourcentage de décès dus aux maladies cardiovasculaires augmente avec l'âge et après 50 ans, ce type de décès excède les 50% de la mortalité totale. Les coûts qu'entraînent ces maladies au niveau du système de la santé sont énormes, avec des chiffres excédant les 20 milliards de dollars à l'an 2000. Pourtant, le contrôle de la tension artérielle est loin d'être optimal, car parmi les 5 millions de personnes souffrant d'hypertension au Canada, moins de 16% sont adéquatement contrôlées.^{2,3}

Bien que l'hypertension pourrait être *secondaire* à diverses conditions, par exemple : déséquilibre endocrinien (e.g. syndrome de Cushing), tumeur (e.g. phéochromocytome), occlusion ischémique rénovasculaire, grossesse et apnée du sommeil obstructive, plus de 90% des patients souffrent d'*hypertension essentielle* ; une pathologie d'étiologie multifactorielle fortement associée à une composante génétique affectant les mécanismes régulateurs de la pression sanguine.

1.1.2. Mécanismes de contrôle de la pression

Avant d'aborder l'hypertension, un survol des mécanismes régulant la pression sanguine est approprié. Les trois paliers de régulation sont le contrôle hémodynamique, l'activité du système nerveux central et autonome et la régulation humorale.

1.1.2.1. Hémodynamie

Les déterminants majeurs de la pression sanguine sont le débit cardiaque et la résistance périphérique totale. Une disproportion entre le volume sanguin pompé (débit cardiaque) et le diamètre total des artères et artérioles (résistance totale périphérique) engendrent une augmentation de la pression artérielle systémique au-delà du seuil de la normale. Quoique secondaire, la viscosité du sang est un déterminant de la pression étant donné que son augmentation pourrait réduire la vitesse du flot contribuant ainsi à augmenter la pression.

1.1.2.2. Système nerveux central et autonome

Le système nerveux central (SNC) joue un rôle important dans la régulation de la pression artérielle. En contrôlant l'activité du système nerveux autonome (SNA) périphérique et le relâchement d'hormones, le SNC modifie de façon aiguë la pression artérielle facilitant l'homéostasie cardiovasculaire et la réponse appropriée à l'environnement. Les mécanismes neuronaux médiés par le système nerveux sympathique (SNS) et parasympathique répondent rapidement aux changements métaboliques avec des réponses de courte durée. D'autre part, les réponses aux mécanismes humoraux médiés par les hormones circulantes et les substances vasoactives produites localement telles l'angiotensine II, la vasopressine, l'endothéline peuvent avoir lieu en quelques minutes avec une action pouvant durer plusieurs jours.

La modulation baroréflexe du système cardiovasculaire a pour fonction de maintenir la pression artérielle dans les limites normales. Une élévation soudaine

de la pression activera les barorécepteurs vasculaires et cardiaques qui transmettront au tronc cérébral cette information dont l'intégration déterminera une réponse inhibitrice sur l'activité des fibres du SNS permettant le rétablissement de la pression. D'autre part, une chute de pression produira l'effet opposé via l'activation des fibres du SNS périphériques. Dans des conditions normales, l'homéostasie de la pression artérielle est maintenue par le fonctionnement harmonieux de ces voies réflexes. Cependant, sous l'influence de l'hypertension artérielle soutenue, le seuil d'activation de la voie réflexe se recalibre à un niveau de pression plus élevée ayant pour conséquence le maintien de la haute pression.⁴

Le SNS peut moduler le système cardiovasculaire en stimulant la médullosurrénale à sécréter les catécholamines, qui elles à leur tour se lient aux récepteurs adrénergiques distribués dans tissus cardiovasculaires et modulent des réponses variées. Plusieurs observations ont démontré que l'augmentation chronique de l'activité sympathique engendre l'hypertension⁵ et qu'en revanche dans presque toutes les formes d'hypertension humaine et expérimentale, l'activité sympathique est élevée. Ainsi, la contribution importante des catécholamines dans la régulation de la pression artérielle à été démontré à maintes reprises. Il reste à savoir quels sont les médiateurs qui assurent l'induction et le maintien des changements chroniques de l'activité sympathique. Un des signaux candidats est l'angiotensine II (AngII) dérivé du système rénine-angiotensine (SRA).

En fait, le SNA forme des interactions multiples avec le SRA. Au niveau de la périphérie, l'interaction entre les deux systèmes est réciproque puisque d'une part, le SNS stimule la sécrétion de la rénine des cellules juxtaglomérulaires des artérioles afférentes rénales via l'activation des récepteurs β -adrénergiques, alors que d'autre part, la libération de la noradrénaline des terminaisons nerveuses

sympathiques est facilitée par l'activation des récepteurs présynaptiques AT_1 de l'AngII. Plusieurs études dans les modèles expérimentaux ainsi que chez les patients hypertendus ont démontré l'efficacité antihypertensive des bloqueurs du SRA ainsi que leur capacité à restaurer l'hyperactivité sympathique.

1.1.2.3. Facteurs humoraux

L'ensemble des travaux supporte le concept que l'hypertension essentielle ou secondaire est liée à une inadaptation du contrôle de facteurs humoraux. La régulation humorale de la circulation est définie par le contrôle de la pression due aux substances sécrétées dans l'organisme tels les hormones. Certaines de ces substances sont formées par des glandes spécialisées et transportées par la circulation systémique tandis que d'autres sont produites localement et sont responsables des effets tissulaires locales de la régulation de la pression. Parmi ces facteurs humoraux nous avons des agents vasodilatateurs tels la sérotonine, l'histamine, les prostaglandines, les peptides natriurétiques, la bradykinine et d'autre part, nous avons des agents vasoconstricteurs tels l'épinephrine, la norépinephrine, la vasopressine, l'endothéline, l'aldostérone et l'angiotensine. L'activation de certains facteurs humoraux dans l'hypertension peut être considéré bénéfique, par exemple dans le cas du peptide natriurétique de l'oreillette (ANP : « atrial natriuretic peptide ») dont l'action s'oppose à la vasoconstriction, la rétention du sodium et au stimuli hypertrophique cardiovasculaire, tandis que d'autres facteurs notamment l'AngII dérivé du SRA joue un rôle primaire dans le développement de l'hypertension, participant directement dans la pathogénie et ses complications via des effets opposés (voir section 1.3.3.). Dans le but de concentrer l'introduction sur le modèle utilisé dans la présente thèse, des différents facteurs humoraux associés à l'hypertension artérielle, nous aborderont l'AngII dérivé du SRA et l'endothéline.

1.1.2.3.1. Système rénine-angiotensine

Le SRA est décrit classiquement comme étant un système endocrinien où les peptides sont synthétisés en cascade dans la circulation systémique.⁶ Par ailleurs, la recherche sur le SRA au cours des vingt dernières a mis en évidence l'existence de SRA locaux au niveau de certains tissus. Au début de cette cascade, la rénine, une aspartyl protéase synthétisée par le rein, clive dans la circulation une α_2 -globuline produite par le foie nommé angiotensinogène. Cette réaction produit le décapeptide l'angiotensine I (AngI) qui est ensuite clivée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) ; une protéase principalement d'origine endothéliale se retrouvant en grande quantité dans les poumons et aussi connu sous le nom de kininase II responsable de la dégradation du peptide biologiquement actif la bradykinine (BK). L'action de l'ECA sur l'AngI produit l'octapeptide actif l'AngII qui est transporté aux tissus périphériques par la circulation et médie la majeure partie de ses actions principalement par l'entremise de son récepteur AT₁. Ensuite, l'AngII est rapidement dégradé en AngIII, AngIV, Ang(1-7) et Ang(3-8) par des protéases circulantes ou tissulaires nommées angiotensinases. Cette cascade ainsi que ses médiateurs est illustrée dans la Figure 1.⁷

La fonction primaire du SRA est de maintenir la perfusion lorsque la circulation est compromise par une déplétion du volume sanguin ou un stress hypotenseur.⁸ Ainsi, l'AngII médie des effets inducteurs sur l'augmentation de la pression artérielle telle que la vasoconstriction, la régulation à la hausse du tonus sympathique et la sécrétion de l'aldostérone de la zone gloméruleuse des surrénales produisant ainsi la rétention du sodium au niveau des tubules distaux et collecteurs du rein.

L'importance de SRA va au-delà de la régulation de la pression sanguine et inclut l'homéostasie structurale cardiovasculaire, un phénomène qui est illustré par la

valeur thérapeutique des inhibiteurs de ce système notamment les inhibiteurs de l'ECA et les antagonistes des récepteurs de l'AngII. Les rôles du SRA et de l'AngII dans le système cardiovasculaire seront décrits en détail à la section 1.3.

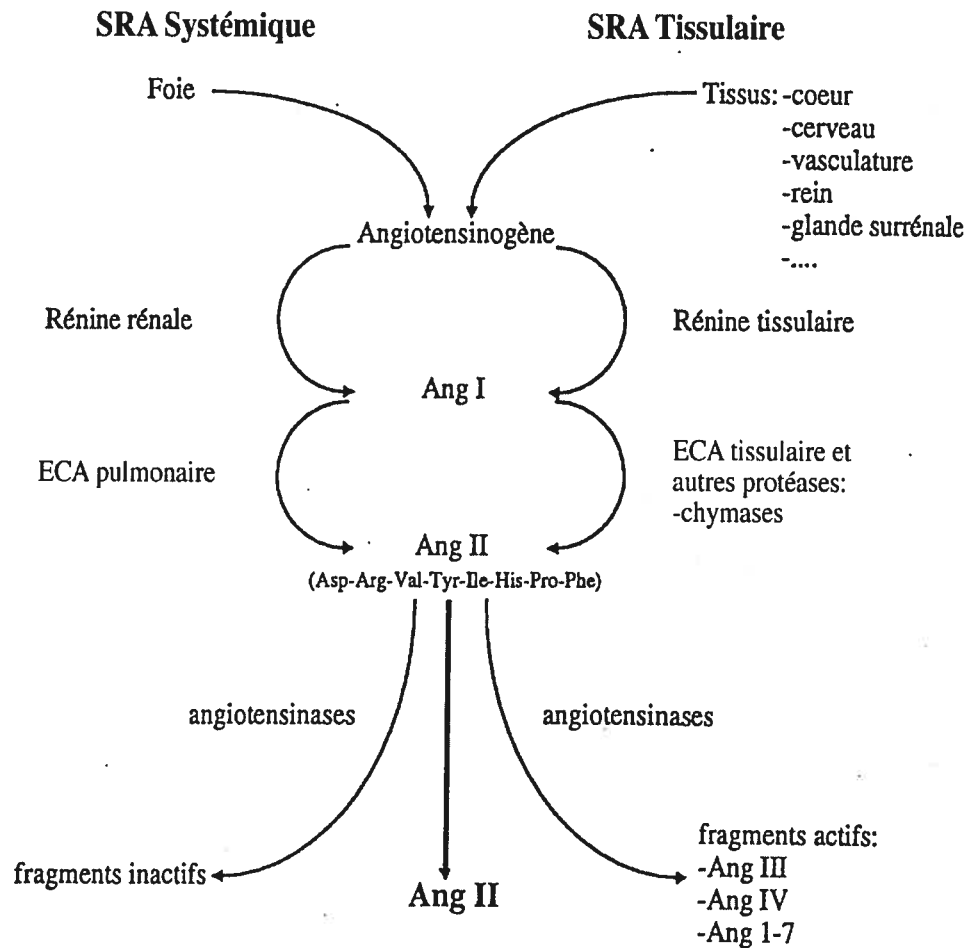


Figure 1 : Schéma du système rénine-angiotensine. Adapté de Timmermans et al.

1.1.2.3.2. Endothéline

Une autre hormone avec une implication importante dans le contrôle de la pression artérielle est l'endothéline (ET). Ce peptide existe sous trois isoformes (ET-1, ET-2 et ET-3) et c'est l'isoforme ET-1 qui est importante dans la biologie et la pathologie humaine. Elle est générée à partir de l'action successive de deux

enzymes de conversion sur sa pro-hormone.^{9,10} ET-1 est un vasoconstricteur puissant qui médie ses effets via ses récepteurs ET-A et ET-B situés au niveau des cellules du muscle lisse (CML). Par contre, elle peut aussi produire des effets vasodilatateurs via ses récepteurs endothéliaux ET-B.^{11,12} De plus, ET-1 médie des effets positifs sur la croissance et la migration cellulaire.¹²

Les contrôles effectués par les divers facteurs humoraux sur la pression sanguine sont rarement des phénomènes dissociables. En effet, ET-1 forme des interactions complexes avec le SRA. Les actions mitogéniques de ET-1 sont abolies par les inhibiteurs de la voie de l'AngII¹³ tandis que les actions trophiques de l'AngII sont atténuées par le blocage des récepteurs ET-A.¹⁴ De plus, AngII stimule la production endothéliale de ET-1 qui elle à son tour peut augmenter la production d'AngII¹⁵ Ce processus d'amplification pourrait contribuer à augmenter les changements de contractilité et de remodelage vasculaire dans l'hypertension.¹⁶ L'importance potentielle de ET-1 dans l'hypertension humaine est corroborée par la réduction de la pression artérielle avec des antagonistes de ses récepteurs.^{17,18}

Les recherches sur les systèmes neuro-humoraux sont à la base du développement de nos traitements pharmacologiques modernes pour l'hypertension. Nos traitements antagonisent les voies de signalisation empruntés par ces facteurs ou renversent directement les conséquences délétères de la stimulation humorale mésadaptée.

1.1.3. Pathophysiologie de l'hypertension artérielle

L'hypertension essentielle humaine est un désordre d'origine multifactorielle avec des composantes à la fois génétiques et environnementales affectant les mécanismes régulateurs de la pression sanguine.

Parmi les divers *facteurs génétiques* prédisposant à la maladie, on retrouve l'histoire familiale d'hypertension, le sexe, l'âge et la race. En effet, chez les caucasiens, la prévalence de l'hypertension essentielle est plus élevée chez les hommes que chez les femmes avant l'âge de 50 ans.¹⁹ Par ailleurs, on retrouve une prévalence plus élevée d'hommes de race noire que d'hommes caucasiens souffrant d'hypertension essentielle et dans cette même population noire, la prévalence d'hypertension est plus élevée chez les femmes et ce dès l'âge de 18 ans.²⁰

De nombreux polymorphismes génétiques sont impliqués dans l'hypertension essentielle. Par exemple, les polymorphismes du métabolisme des stéroïdes sont impliqués dans l'étiologie de l'hypertension cependant celles-ci ont une faible prévalence (<1%). Des différents gènes candidats humains, ceux qui codent pour les composantes du SRA sont considérés comme étant les candidats les plus plausibles puisque le produit clé du système, l'AngII, est considéré avoir des effets dominants sur la pression artérielle, la modulation de l'hypertrophie cardiaque et sur les lésions athérosclérotiques coronariennes.²¹ L'étude des polymorphismes des gènes codant pour les composantes du SRA contribue à déterminer la façon avec laquelle ces polymorphismes génétiques peuvent influencer le développement des maladies cardiovasculaires, interagir avec différents facteurs de risque environnementaux et moduler la réponse des patients à la thérapie.

Plusieurs polymorphismes affectant à la fois le SRA circulant et tissulaire ont été rapportés depuis 1992. Certains de ces polymorphismes peuvent augmenter les produits des gènes tels que ceux de la rénine,²² l'angiotensinogène²³ et l'ECA²⁴⁻²⁶ qui sont susceptibles d'augmenter l'activité du SRA. D'autre part, les polymorphismes du gène du récepteur AT₁ de l'AngII causent une augmentation de la réponse du récepteur au ligand. Parmi les polymorphismes génétiques du

SRA, certains démontrent une association positive avec des pathologies ou des variations dans la réponse pharmacologique alors que d'autres polymorphismes ne semblent pas y être associés. L'association positive des polymorphismes génétiques du SRA avec différentes pathologies du système cardiovasculaires représente un outil potentiel pour l'approche individuelle dans la prévention des maladies cardiovasculaires et dans le choix de la pharmacothérapie.

D'autre part, diverses études épidémiologiques ont démontré que les *facteurs environnementaux* tel le stress, la diète élevée en sodium, l'obésité, la consommation d'alcool, le tabagisme et le niveau socioéconomique des individus représentent des facteurs prédisposant à la haute tension artérielle. L'hypertension artérielle a une prévalence plus élevée et actuellement en croissance dans les sociétés industrialisées.²⁷ Contrairement à ces pays, les populations des pays non-industrialisés affichent une pression sanguine plus basse et qui n'augmente pas obligatoirement avec l'âge. La cause de cette observation étant complexe et pas bien comprise, la diète et les variables psychosociales reliées au style de vie sont à considérer, d'autant plus à cause de l'existence d'une association entre l'augmentation de la pression sanguine et la migration d'une population du milieu rural en milieu urbain.

La stratification de la prévalence de l'hypertension essentielle due aux différents déterminants (génétiques, environnementales, autres) démontre la nécessité d'une approche diversifiée dans la thérapie.

1.1.4. Complications associées à l'hypertension artérielle

La régulation de la pression sanguine représente une fonction physiologique excessivement complexe qui dépend de l'intégration de plusieurs fonctions cardiovasculaires, rénales, neurologiques et endocriniennes. Quoique l'hypertension est avant tout un désordre de la régulation de la pression sanguine,

les patients sont souvent asymptomatiques au stade initial. Cependant, le diagnostic précoce de l'hypertension est d'une très grande importance clinique car l'augmentation chronique de la pression produit des effets délétères au niveau des organes cibles tel le cœur et les reins et exacerbe les facteurs de risques pour les pathologies vasculaires comme la dysfonction endothéliale.

1.1.4.1. Dommage aux organes cibles

Plusieurs études expérimentales et cliniques ont démontré qu'une pression artérielle élevée soutenue cause des dommages aux organes cibles de l'hypertension en modulant leur structure et fonction. Parmi les pathologies engendrées, on note la maladie coronarienne, les accidents vasculaires-cérébrales (AVC), la pathologie rénale, l'infarctus du myocarde, la dysfonction ventriculaire systolique/diastolique, la sténose des artères périphériques et de la carotide, la rétinopathie et les anévrismes. La majorité des complications cardiovasculaires de l'hypertension proviennent des mécanismes de compensation que provoque la pression sanguine élevée i.e. hypertrophie vasculaire et ventriculaire, ou de la contribution qu'elle apporte aux dommages vasculaires, la dysfonction endothéliale, l'athérosclérose, la néphrosclérose etc.

1.1.4.2. Dysfonction endothéliale

Il existe un certain nombre de facteurs qui peuvent causer un dommage à l'endothélium vasculaire et mener à l'athérosclérose tels le cholestérol, le diabète, l'hypertension, le tabagisme.²⁸ Le terme *dysfonction endothéliale* a été utilisé pour décrire plusieurs conditions pathologiques incluant l'altération des propriétés d'inflammation et de coagulation.²⁹ Cependant, dans la plupart des travaux de la littérature, ce terme est utilisé pour désigner une dysfonction de la relaxation endothélium-dépendante dans la paroi vasculaire causée par une perte de la bioactivité du médiateur vasorelaxant : le monoxyde d'azote (NO). La diminution de l'activité du NO peut être due :

- 1) à une réduction de l'expression de l'enzyme qui la synthétise : la NO synthase endothéliale (eNOS),³⁰
- 2) au manque de la biodisponibilité de substrats (L-arginine) ou de co-facteurs essentiels (BH₄ : tetrahydrobiopterine),³¹
- 3) au manque de la signalisation cellulaire tel qu'une déficience d'activation de eNOS,³²
- 4) à une dégradation accélérée de NO par les espèces réactives d'oxygène (ou « reactive oxygen species » ROS), principalement le superoxide.³³

Même si le terme dysfonction endothéliale sert avant tout pour décrire la perte de la fonction vasorelaxante du NO, il est à savoir que l'endothélium dysfonctionnel produit plus d'eicosanoides constricteurs tels les prostaglandines³⁴ et potentialise aussi l'effet constricteur du calcium intracellulaire dans les CML.³⁵ Dans tous les cas, la dysfonction endothéliale représente un facteur de risque pour le contrôle déficient de la croissance vasculaire, le remodelage pathologique, les événements cardiovasculaires³⁶ et une aggravation des dommages d'ischémie/réperfusion, athérosclérotiques, de resténose, etc.

Il est présentement controversé à savoir si la dysfonction endothéliale est une anomalie primaire ou une conséquence de la haute pression sanguine. Certains proposent que l'augmentation des forces hémodynamiques augmente la relâche des ROS, lesquelles interfèrent avec la synthèse et/ou l'action des médiateurs dérivés de l'endothélium.³⁷ En fait, l'analyse de résultats obtenus chez différents modèles expérimentaux d'hypertension génétique suggère qu'un dommage direct aux cellules endothéliales serait un phénomène secondaire à l'augmentation prolongée de la tension hémodynamique et du stress du flot laminaire.³⁸ Chez des patients souffrant d'hypertension secondaire, la dysfonction endothéliale a été observée même si aucune prédisposition génétique à l'hypertension n'a été

observée.³⁸ Cependant, chez la progéniture normotensive de parents hypertendus, une altération précoce à la vasodilatation endothélium-dépendante a été notée suggérant un rôle possible pour la prédisposition génétique à la dysfonction endothéliale dans l'hypertension humaine.³⁹ L'identification de marqueurs génétiques pour la dysfonction endothéliale est un processus en cours.⁴⁰

La relaxation endothélium-dépendante compromise a été associée à une dégradation du NO par l'action oxydante des ROS dans des modèles expérimentaux de maladies incluant l'hypertension, le diabète, la défaillance cardiaque ainsi que dans plusieurs facteurs de risque tels que le tabagisme.⁴¹ Les résultats de ces études ont de plus été confirmés chez l'humain. Enfin, il a été démontré que les vitamines antioxydantes augmentent la vasodilatation endothélium-dépendante dans l'artère coronaire et la circulation brachiale chez l'humain.⁴²

1.1.5. Traitement de l'hypertension artérielle

Le principal bénéfice à traiter l'hypertension artérielle consiste à diminuer le risque de complications cardiovasculaires. Le fait de recourir aux antihypertenseurs et de diminuer de 5-6 mmHg la tension chez un patient hypertendu d'âge moyen diminue le risque d'AVC ou d'événements coronariens de 42% et 16% respectivement. De plus, les antihypertenseurs utilisés chez les personnes âgées réduisent la mortalité totale de 20%, la mortalité liée aux causes cardiovasculaires de 33%, l'incidence d'AVC de 40% et les complications de la maladie coronarienne de 15%.¹

Vu la complexité de l'hypertension artérielle, son origine multifactorielle et sa polygénicité, il est évident qu'il n'existe pas un traitement unique et universel. C'est cette même complexité qui a déterminé la multiplicité des traitements. Parmi ceux-ci nous avons le traitement pharmacologique conventionnel avec des

médicaments reconnus (et d'autres qui frayent leur chemin sur le marché) ainsi que le traitement non-pharmacologique, depuis le changement des habitudes de vie jusqu'à la thérapie génique.

1.1.5.1. But et approches

Le concept du traitement de l'hypertension artérielle semble être simple et direct : diminuer la tension artérielle élevée et de ce fait réduire l'incidence des évènements cardiovasculaires. L'analyse des informations produites par la multitude d'études cliniques et épidémiologiques démontre que même les formes relativement non-sévères d'hypertension sont des indices d'évènements cardiovasculaires et que la réduction de la tension artérielle diminue le risque de ces incidences. Comme mentionné plus haut, l'hypertension n'est pas uniquement un problème de haute pression artérielle, c'est aussi un syndrome de déséquilibre métabolique et d'anomalies cardiovasculaires.^{43,44} Des aberrations dans le métabolisme des lipides, du glucose, de l'insuline, de la fonction rénale en plus de changements dans la structure des ventricules et des vaisseaux semblent être impliqués⁴⁵ et sont considérés en clinique.

La prévalence d'évènements cardiaques chez les hypertendus s'explique par la grande incidence d'anomalies vasculaires qui peuvent être d'origine génétique ou autre. La persistance de la tension artérielle élevée représente un facteur de risque additionnel qui maintient ou pousse vers un état critique de la morbidité. À partir de cette prémisse, un traitement optimal avec un bon pronostic à long terme requiert le traitement d'attributs autres que la haute pression. Idéalement, la thérapie antihypertensive devrait être anti-croissance ou avoir d'autres propriétés (e.g. stimuler l'apoptose dans certaines cellules (voir section 5.2.1.), rétablir la fonction endothéliale) qui pourraient inhiber les changements cardiovasculaires telle l'hypertrophie et l'hyperplasie cellulaire en plus du développement de maladies sous-jacentes telle l'athérosclérose. Même si la diminution de la haute

pression est nécessairement le but premier dans le traitement de l'hypertension et des complications immédiates, les buts intermédiaires et à long terme devraient inévitablement être la correction du remodelage cardiovasculaire (section 1.2.3.).

1.1.5.2. Traitement pharmacologique

Les agents pharmacologiques produisent leur effet en interférant avec les mécanismes de régulation de la pression sanguine. Une classification utile de ces agents est de les regrouper selon leur site d'action ou le mécanisme ciblé.

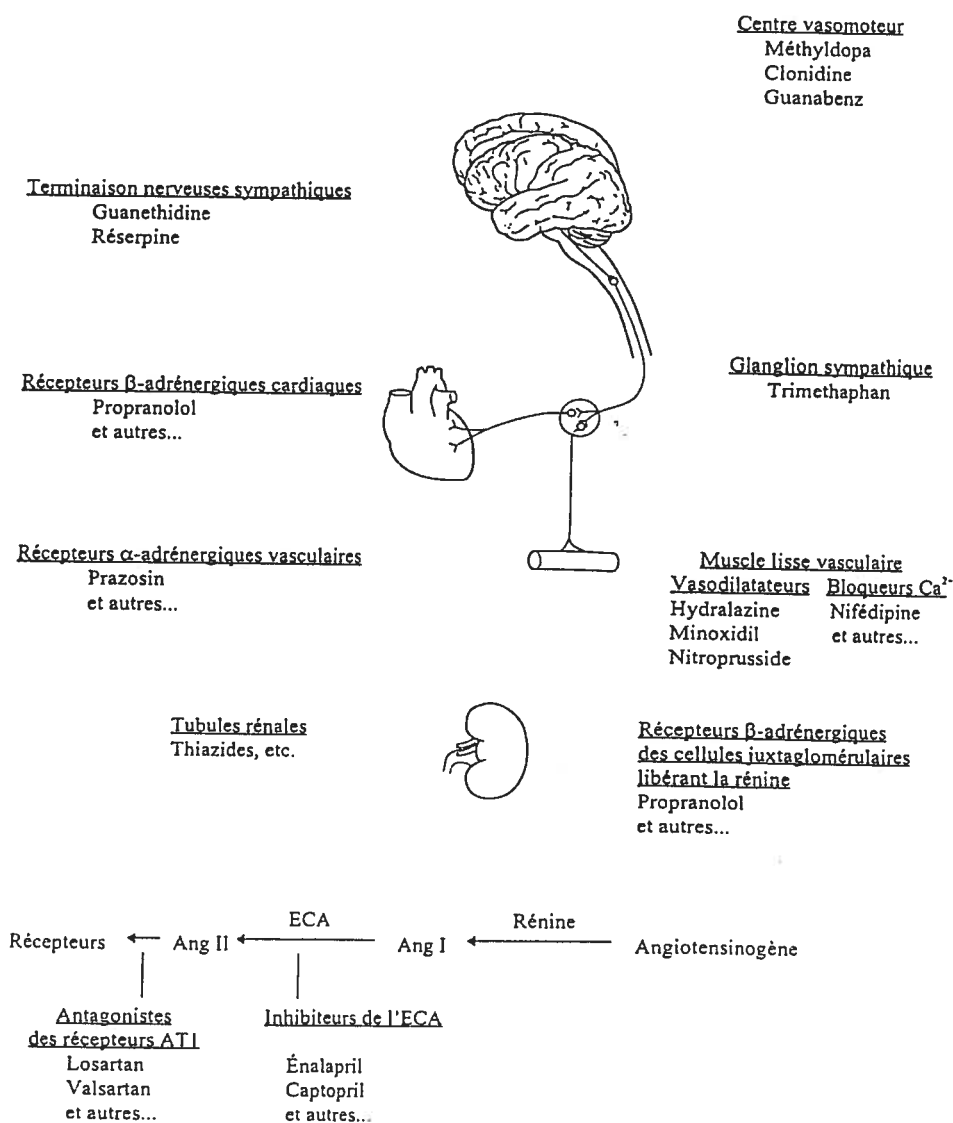


Figure 2 : Sites d'action des classes majeures d'agents antihypertenseurs.

1.1.5.2.1. Classes d'agents antihypertenseurs

Les antihypertenseurs à action centrale ont été parmi les premiers médicaments introduits sur le marché. Ils atténuent l'activité du SNC responsable du maintien du débit sanguin, du tonus artériel et du volume de fluides corporels. Clonidine et α -méthyldopa agissent au niveau du centre vasomoteur, tandis que la réserpine agit au niveau des terminaisons nerveuses sympathiques.

Les diurétiques sont subdivisés en trois catégories : les thiazides (e.g. chlorthalidone), les diurétiques de l'anse (e.g. furosémide) et les diurétiques épargneur de potassium (e.g. spironolactone). Ils agissent au niveau des tubules rénaux pour augmenter l'excrétion de sodium et d'urine.^{46,47} La déplétion volumique, la réduction de la résistance totale périphérique et la diminution de la pression artérielle suivent une séquence déterminée durant un traitement chronique aux diurétiques.⁴⁸

Les antagonistes adrénergiques sont sélectifs soit pour les adrénorécepteurs α qui médient principalement les fonctions excitatrices des catécholamines, soit pour les adrénorécepteurs β qui médient les fonctions inhibitrices (à l'exception du cœur où β est excitateur). En plus de diminuer la pression sanguine, les β -bloqueurs sont considérés comme traitement de première ligne pour les patients angineux, souffrant de cardiomyopathie, de défaillance cardiaque,⁴⁹⁻⁵¹ et réduisent la mortalité chez des patients ayant survécu à un infarctus.⁵²⁻⁵⁴ Les β -bloqueurs classiques non-sélectifs comme le propranolol et les bloqueurs β_1 -sélectifs comme l'aténolol diminuent la pression artérielle par la réduction du débit cardiaque due à l'inhibition compétitive de l'activité sympathique du nœud sino-atrial. Certains agents diminuent aussi l'activité de la rénine et baissent la pression chez les hypertendus avec une haute activité plasmatique de cet enzyme.⁵⁵ Le mécanisme d'action des antagonistes α -adrénergiques tel le prazosin est l'inhibition des récepteurs post-synaptique avec une haute sélectivité pour les récepteurs α_1 ,

diminuant ainsi la pression artérielle par la réduction de la résistance vasculaire périphérique. Le labetolol indiqué pour le traitement d'urgences hypertensives inhibe à la fois les récepteurs α et β adrénergiques.

Les vasodilatateurs directs diminuent la pression sanguine par la dilatation des vaisseaux périphériques. Ils peuvent agir soit sur les vaisseaux de résistance, les grosses artères et les vaisseaux de capacitance (veines). Une action prédominante sur les vaisseaux de résistance pourrait causer une baisse immédiate de la pression artérielle. À l'inverse, une relaxation des vaisseaux de capacitance cause une réduction du retour veineux au cœur et une chute du débit cardiaque associée à une baisse de la pression.⁵⁶ L'hydralazine est le seul membre de cette classe employé souvent comme thérapie de second ou troisième choix.

La plupart des antagonistes calciques agissent en bloquant le canal calcique voltage dépendant du type L qui représente la voie majeure d'entrée du calcium dans le muscle lisse vasculaire suite à la dépolarisation. Sur la base de la structure chimique, trois groupes majeurs d'antagonistes calciques peuvent être distingués : la classe des phénylalkylamines (e.g. verapamil), des benzothiazépines (e.g. diltiazem) et des dihydropyridines (e.g. nifedipine). Les effets pharmacologiques des antagonistes calciques incluent la vasodilatation périphérique et la réduction de la contractilité du myocarde.⁵⁷

Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (iECA) réduisent les niveaux d'AngII circulants ce qui mène à une diminution des effets du peptide sur le tonus vasculaire,⁵⁸ l'expansion volumique à travers la rétention sodique via l'aldostérone et la rétention de fluide via la vasopressine (AVP).⁵⁹ Un autre mécanisme à plus long terme des iECA serait l'inhibition des actions trophiques de l'AngII induisant une régression structurale cardiovasculaire contribuant au maintien de la réduction de la pression artérielle. De plus, il a été démontré que

les iECA interfèrent avec la transmission sympathique en antagonisant l'action facilitatrice de l'AngII sur le relâchement des transmetteurs présynaptiques et que les iECA diminuent la dégradation des kinines dont la bradykinine (BK) ce qui pourrait potentialiser la vasorelaxation endothélium-dépendante. Captopril est le prototype des iECA. Son groupement sulfhydryl pourrait lui conférer des propriétés antioxydantes.^{60,61} Subséquemment, la pro-drogue enalapril un composé à longue durée d'action a été commercialisé. Les iECA sont structurellement hétérogène du point de vue de leur groupements, profil d'absorption, liaison aux protéines, demi-vie, métabolisme et lipophilicité ; cependant elles agissent tous de façon similaire quant à leur mécanisme hypotenseur.

Les antagonistes des récepteurs AT₁ de l'AngII ont été développés suite à des recherches exhaustives essayant de trouver de nouveaux composés plus sélectifs, et réduisant les effets secondaires des iECA, comme la toux et l'œdème pulmonaire dû à la diminution de la dégradation des kinines.^{62,63} Le premier agent de cette lignée a été le saralasin qui a dû être abandonné à cause de son effet agoniste partiel et de sa voie d'administration enterale à cause de sa nature peptidique. Ensuite furent développés les antagonistes non-peptidiques et oralement actifs dont le chef de file le losartan a été suivi par le valsartan ; un diacide structurellement similaire au métabolite actif du losartan, le EXP-3174. Les antagonistes AT₁ inhibent les effets contractiles de l'AngII sur les préparations de CML vasculaires *in vitro*, et *in vivo* elles préviennent ou renversent tous les effets connus de l'AngII soit les réponses pressives rapides et lentes, les effets stimulateurs du SNS périphérique, tous les effets du SNC (la soif, le relâchement de l'AVP, le tonus sympathique), le relâchement des catécholamines adrénaliens, la sécrétion d'aldostérone et les effets sur la croissance. De plus, en augmentant les niveaux plasmatiques d'AngII, les

antagonistes AT_1 peuvent être responsables d'effets médiés par la stimulation indirecte des récepteurs AT_2 (voir section 1.3.3.).

1.1.5.2.2. Nouvelles classes

Les antagonistes de l'endothéline sont hautement sélectifs soit pour les récepteurs ET-A ou ET-B. De plus, il existe des agents qui ont une affinité croisée pour les deux sous types tel le bosentan. Des études expérimentales ont démontré l'efficacité des antagonistes ET-1 pour la réduction de la pression et la régression de l'hypertrophie artérielle,^{64,65} ainsi que fibrose cardiaque perivasculaire chez le SHR.⁶⁶ Des études cliniques ont démontré que le bosentan donné à des patients avec hypertension légère à modérée sur une période d'un mois à une dose inférieure à celle de l'enalapril représente un traitement bien toléré et aussi efficace que ceux avec l'iECA. L'évaluation clinique de ces médicaments permettra de mieux comprendre l'utilité thérapeutique et les implications pathophysiologiques de l'endothéline dans la maladie humaine, ainsi que son rôle dans la régulation de la fonction cardiovasculaire.

L'inhibiteur des vasopeptidases inhibe simultanément 2 enzymes clés impliqués dans le contrôle des fonctions cardiovasculaires : l'endopeptidase neuronale (NEP) et l'ECA. L'inhibition de l'ECA bloque la formation de l'AngII et atténue ainsi ses propriétés vasoconstrictrices et trophiques en plus de potentialiser ces effets par la diminution de la dégradation de la BK tel que nous avons décrit ci-haut. D'autre part, l'inhibition de la NEP bloque l'inactivation de plusieurs peptides régulatrices incluant les peptides natriurétiques. Ceci a pour effet d'augmenter la vasodilatation, la natriurèse et la cardioprotection via l'augmentation des niveaux d'ANP et de BK. Le concept de minimiser l'activité vasoconstrictrice et pro-croissante d'un système en plus de potentialiser simultanément l'effet vasodilatatrice, antihypertrophique et natriurétique d'un

autre système est ce qui a encouragé la course au développement de ces molécules. Omapatrilat représente un exemple typique de cette classe.

1.1.5.2.3. Suppléments

L'acide aminé L-arginine sous l'action de l'enzyme NO synthase (NOS) est convertie en NO et en citrulline. La pharmacologie clinique entière de la L-arginine a récemment été revue.⁶⁷ La supplémentation en L-arginine a démontré des effets bénéfiques sur le système cardiovasculaire en prévenant l'hypertrophie de la paroi vasculaire dans des coronaires de lapins et en diminuant la formation néointimale post-angioplastie dans ce même modèle et chez le rat. Il est reconnu que l'administration de L-arginine améliore les symptômes cliniques de la maladie coronarienne et de la défaillance cardiaque. La supplémentation orale en L-arginine réduit la réactivité plaquettaire et améliore la vasodilatation endothélium-dépendant des coronaires de patients hypercholestérolémiques,⁶⁸ et l'infusion intraveineuse diminue la résistance vasculaire périphérique, la pression artérielle puis améliore le flot sanguin durant ischémie des membres inférieurs.⁶⁹

La tetrahydrobiopterine (BH₄) est un cofacteur indispensable de la NOS. Son apport exogène corrige la dysfonction endothéliale dans les vaisseaux de rats hypertendus (SHR).^{70,71} Inversement, l'inhibition de la synthèse de BH₄ induit la dysfonction de NOS dans des vaisseaux isolés de rats normotendus. Plusieurs études cliniques ont suggéré l'implication importante du BH₄ dans l'homéostasie de l'endothélium.^{72,73} Des études biochimiques ont démontré que des concentrations suboptimales du BH₄ engendrent la production du peroxyde d'hydrogène par la NOS⁷⁴ dont la production soutenue induit le stress oxydatif et des dommages vasculaires.⁷⁰ Nous aborderons le sujet du stress oxydatif plus en détail à la section 1.3.4.6.2). De même, de nouvelles données cliniques attestent de l'implication critique du BH₄ dans la dysfonction endothéliale, et il a été démontré que son administration corrige la fonction endothéliale chez les

fumeurs. D'autre part, certaines évidences démontrent que le BH_4 pourrait agir comme antioxydant direct.^{75,76} La forme active de l'acide folique, le 5-méthyltetrahydrofolate, est un supplément alimentaire qui stimule la biodisponibilité du BH_4 et corrige la fonction endothéliale chez les patients hypercholestérolemiques.⁷⁶ Chez les patients souffrant d'hypertension essentielle, la fonction vasculaire compromise par le stress oxydatif est un facteur de risque pour le développement de lésions athérosclérotiques ; une des complications des plus sévères de la tension artérielle. Ainsi, la supplémentation chronique de folates augmenterait la biodisponibilité du BH_4 ,^{76,77} et pourrait constituer une nouvelle avenue thérapeutique pour le traitement de l'hypertension.

Plusieurs études ont examiné le rôle des antioxydants dans la fonction vasculaire et dans la prévention des maladies cardiovasculaires, compte tenu que le stress oxydatif provoqué par la dysfonction endothéliale représente un facteur de risque majeur pour les complications et la morbidité cardiovasculaire. Des études ont démontré que l'administration i.v. de l'acide ascorbique (vitamine C) améliore la vasodilatation chez les patients diabétiques, fumeurs ou hypercholestérolemiques et chez des patients en défaillance cardiaque. La vitamine C améliore la vasodilatation endothélium-dépendante chez les patients hypertendus et sa co-administration avec la L-arginine augmente grandement la vasodilatation chez des patients souffrant de malaises coronariens.⁶⁹ De plus, l'étude randomisée *Cambridge Heart Antioxidant Study* (CHAOS) a démontré qu'une forte dose d'alpha-tocophérol (vitamine E) réduit significativement l'incidence des décès due aux événements cardiovasculaires et diminue les infarctus du myocarde chez des patients athérosclérotiques versus le traitement placebo.⁷⁸ Par ailleurs, l'étude *Heart Outcomes Prevention Evaluation Study* (HOPE) n'a montré aucun effet marqué de la supplémentation en vitamine E sur les événements cardiovasculaires chez des patients à haut risque.⁷⁹ Une autre étude présentement en cours (SU.VI.MAX) *Supplémentation en Vitamines et Minéraux Antioxydants* étudie à

partir de 12,735 individus suivis l'efficacité de la supplémentation en antioxydants dans la prévention d'évènements cardiovasculaires.⁸⁰

1.1.5.3. Traitement non-pharmacologique

Selon une analyse des données de l'étude de Farmingham, près de 40% des individus qui sont dans la catégorie de patients avec tension artérielle normale à élevée évolueraient à court terme vers l'hypertension. Il est donc recommandé d'assurer une surveillance de la tension artérielle et au besoin entreprendre des actions non-pharmacologiques

Les interventions non-pharmacologiques (perte de poids, modification des habitudes alimentaires, régime d'exercice quotidien, cessation de fumer, diminution de la consommation d'alcool, gestion du stress, etc.) sont généralement bénéfiques pour réduire une variété de facteurs de risque cardiovasculaire dont l'hypertension¹ et devraient donc être employés en tant que traitement définitif ou en combinaison avec la thérapie pharmacologique, car celles-ci peuvent réduire la tension artérielle, par conséquent diminuer la dose d'agents pharmacologiques requis pour le traitement.⁸¹

1.1.5.4. Thérapie génique

Même avec la multitude de traitements pharmacologiques actuels, la haute pression artérielle d'une grande proportion de patients n'est pas adéquatement contrôlée. Ceci est en partie due au fait que tous les médicaments ont une action de courte durée, ne sont pas hautement spécifiques et présentent des effets secondaires. De plus, la question de la compliance du patient au traitement pharmacologique quotidien entre en jeu. La thérapie génique offre la possibilité de produire des effets thérapeutiques à long terme avec une spécificité propre au profil génétique du patient et rend la question de la compliance moins importante.

Les études précliniques en thérapie génique pour l'hypertension ont emprunté deux approches. La première consiste à transférer des gènes codant pour des protéines vasodilatatrices. Chao et al. ont transférés avec succès les gènes de la kallikréine (enzyme générant les kinines), de l'ANP, de la NOS endothéliale (eNOS), dans différents modèles d'hypertension expérimentale. Leurs résultats démontrent une réduction soutenue de la pression sanguine pour une période de 3-12 mois suite à l'expression de ces gènes.⁸² La deuxième approche consiste à invalider les gènes codant pour des protéines impliquées dans la transmission du signal vasoconstricteur. Raizada et al. ont utilisé une approche antisense pour cibler et diminuer l'expression de l'angiotensinogène ou le récepteur AT₁ de l'AngII dans plusieurs modèles d'hypertension.⁸³ Deux méthodes de transfert existent dont le premier est le transfert direct de courtes séquences d'oligonucléotides, tandis que la seconde est le transfert de séquences complètes d'ADN en se servant de vecteurs viraux. En tous les cas, ces études démontrent une réduction de la pression sanguine durant plusieurs semaines, voir même des mois en plus d'avoir des effets cardioprotecteurs tels la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire et la diminution de la fibrose.⁸⁴

1.1.6. Modèles expérimentaux d'hypertension artérielle

Les modèles expérimentaux d'hypertension sont fréquemment employés pour étudier les mécanismes de contrôle de la pression artérielle, pour tester ou développer des agents antihypertenseurs et pour comprendre la pathogenèse de l'hypertension. Nous avons à notre disposition plusieurs modèles d'hypertension primaire et secondaire. Parmi les modèles génétiques, nous retrouvons le rat spontanément hypertendu, le rat sensible au sel (Dahl), le rat hypertendu de Milan, Lyon et New Zealand. Tandis que parmi les modèles d'hypertension secondaire les plus couramment utilisés, nous retrouvons le rat DOCA-sel, les modèles de surcharge pressive (e.g. coarctation de l'aorte), le rat infusé à l'angiotensine et le modèle « two-kidney one-clip ». Grâce à ces modèles, des

progrès substantiels ont été réalisés dans l'identification des facteurs physiologiques, biochimiques et environnementaux dans la pathogenèse de la maladie.

L'approche la plus utilisée pour développer des modèles d'hypertension génétique est de mesurer la pression artérielle d'un très grand nombre d'animaux co-sanguins et d'accoupler sélectivement ceux qui ont les valeurs les plus élevées. Suite à 20 générations d'accouplements, les rats obtenus sont homozygotes pour >99% des loci, et la nouvelle souche est composée d'une population génétiquement identique.

Notre groupe étudie l'hypertension principalement à partir du rat spontanément hypertendu car tel qu'approfondi dans la prochaine section et à la section 5.1, c'est un modèle qui présente une hyperplasie et une hypertrophie cellulaire dès la naissance et c'est le premier modèle existant d'apoptose thérapeutique.

1.1.6.1. Le rat spontanément hypertendu

Le rat spontanément hypertendu (SHR), développé à l'Université de Kyoto par Okamoto et Aoki en 1963, est dérivé d'un accouplement sélectif de rats Wistar ayant les valeurs de pressions artérielles les plus élevées. À partir de la sixième génération d'accouplement co-sanguin, les animaux ont développé une pression excédant dans plusieurs cas 190 mmHg à environ 20 semaines d'âge. Les différences entre le SHR et le rat normotendu Wistar-Kyoto (WKY) peuvent être observées durant la première journée post-natale où la pression dans des conditions basales des rats SHR est légèrement plus élevée.^{85,86} À partir de 3 semaines d'âge, les artères des SHR démontrent des changements trophiques quant à l'augmentation du ratio paroi:lumière impliquée dans le développement et le maintien de la maladie. La haute pression artérielle et les propriétés prolifératives des CML peuvent participer à ces changements structuraux.^{87,88} De plus, une

association entre l'hypertrophie ventriculaire gauche et l'hypertrophie vasculaire à été démontré chez le SHR sans nécessairement corrélér avec la pression artérielle,⁸⁸ ce qui indique l'implication de divers autres facteurs.^{89,90}

Des études *in vitro* démontrent que les CML aortiques de SHR ont une grande capacité de renouvellement (croissance et mort cellulaire).^{91,92} Ceci a été évalué chez des SHR et WKY dont l'ADN a été marqué *in utero* avec la [³H]-thymidine et la vitesse de disparition de l'ADN radiomarqué a été mesuré depuis la naissance jusqu'à 20 semaines d'âge.⁹³ Chez le SHR comparativement au WKY, la masse aortique des rats néonataux a augmenté de façon transitoire et redescendu à des niveaux hypotrophiques à 8 semaines d'âge. Cependant l'hypertrophie est réapparue à 20 semaines. Il est à noter que l'hypertension ainsi que l'hypertrophie chez le SHR est bien établie à 11 semaines d'âge. La diminution de l'ADN marqué avec le temps chez les SHR et WKY couplé avec l'augmentation de l'ADN total suggère que les cellules pré-marqués *in utero* meurent et sont remplacés. En fait, la diminution du [³H]-ADN depuis la naissance jusqu'à 8 semaines est approximativement 3 fois plus élevé chez les SHR que les WKY démontrant la grande capacité de renouvellement cellulaire de ce modèle.

Trois complications cardiovasculaires majeures ont été notées chez ces rats soit l'hypertrophie ventriculaire gauche, les AVC et la néphrosclérose qui sont des pathologies caractéristiques du SHR mais plus particulièrement du SHR-SP (« stroke prone SHR »). Le développement de cette lignée démontre beaucoup de similarités avec l'hypertension essentielle chez l'humain. Dans les deux cas, l'hypertension se prononce jeune et la condition est aggravée par une diète riche en sodium.

1.2. REMODELAGE CARDIOVASCULAIRE DANS L'HYPERTENSION

Les maladies vasculaires et cardiaques impliquent des changements dans la structure cardiovasculaire. La structure normale est maintenue par un équilibre sophistiqué de plusieurs processus cellulaires et mécaniques. Un débalancement de cet équilibre entraîne le *remodelage* qui implique un changement de la réponse de divers types cellulaires du système cardiovasculaire i.e. hyperplasie et hypertrophie cellulaire, production, dépôt et dégradation exagérée des composantes de la matrice extracellulaire. L'hypertension se manifeste par ces changements structuraux morbides.

1.2.1. Le Cœur

1.2.1.1. Structure cardiaque

Afin de simplifier notre compréhension physiologique de cet organe complexe, Weber et al. considèrent le cœur étant formé essentiellement de deux « compartiments » de cardiocytes : le compartiment de non-cardiomyocytes et le compartiment contractile cardiomyocytaire. Le compartiment de non-cardiomyocytes comprend :

- 1) les CML qui sont retrouvés dans les artères et artérioles coronariens intramyocardiques,
- 2) les fibroblastes cardiaques responsables de la production des protéines structurales de la matrice interstitielle dont le collagène et l'élastine,
- 3) les cellules endothéliales qui forment la lignée ubiquitaire coronarienne et du système lymphatique,
- 4) les cellules mésothéliales du péricarde faisant partie de la plèvre cardiaque et exprimant des métalloprotéases matricielles⁹⁴ ainsi que d'autres facteurs modulatrices de la fonction des cardiomyocytes et des non-cardiomyocytes tel l'AngII,⁹⁵

- 5) les macrophages puis les cellules mastocytaires faisant partie du système immunitaire local.⁹⁶

Le compartiment cardiomyocytaire est composé exclusivement de cardiomyocytes. Ces cellules sont les plus volumineuses et occupent environ 70-75% de l'espace structurel. Cependant en termes de nombre de cellules, les cardiomyocytes ne représentent que 30% du nombre cellulaire total⁹⁷ tandis que la majorité des cellules en termes de nombre dans le cœur sont les fibroblastes.

Le développement normal du cœur est basé sur l'équilibre de la croissance entre ces deux compartiments cardiomyocytaire et de non-cardiomyocytes. Cependant, l'hypertrophie pathologique due à une surcharge de pression est caractérisée par un déséquilibre de l'homéostasie entre ces deux compartiments cellulaires.

1.2.1.2. Pathophysiologie dans l'hypertension

Environ quatre décès sur cinq chez les patients hypertendus non-contrôlés sont dus aux événements cardiaques (43% défaillance, 36% insuffisance coronarienne), alors que les causes cérébrovasculaires et rénales sont moins fréquentes (avec 14% et 7% d'incidence respectivement).¹ Une étude clinique réalisée sur plus de 900 patients a démontré une relation inverse entre la taille du cœur et sa fonction mesurée par la fraction d'éjection, et ce dans la majorité des maladies congénitales et acquises dont l'hypertension.⁹⁸

L'hypertension artérielle est la cause la plus commune de la surcharge pressive⁹⁹ et mécanique⁹⁷ du ventricule gauche. Au stade initial, cette surcharge résulte en une hypertrophie dite *compensée* qui est caractérisée par un épaissement de la paroi et du septum ventriculaire avec cependant un volume de la chambre interne du ventricule normal (ratio masse/volume ventriculaire interne élevé). Il est à noter que c'est dans ce cadre même que portent nos travaux sur l'hypertrophie.

Avec la persistance de la tension artérielle, l'hypertrophie devient *décompensée*, c'est-à-dire que les ventricules deviennent larges avec un volume diastolique élevé, le ratio masse/volume est par conséquent réduit. Cet état se détériore pour aboutir à la défaillance cardiaque.

Un nombre important de facteurs régulent le développement de l'hypertrophie. La durée de la charge de pression, le rythme et la contractilité cardiaque, les influences humorales et les facteurs génétiques en sont des déterminants. Du point de vue physiologique, il existe en théorie trois catégories d'hypertrophie ventriculaires affectant la fonction cardiaque pouvant être diagnostiquées soit l'hypertrophie *concentrique*, *irrégulière* et *excentrique*.

Hypertrophie concentrique

L'augmentation de la charge artérielle induit une hypertrophie myocardique concentrique avec une augmentation de l'épaisseur de la paroi et de la masse musculaire du ventricule gauche et une élévation du ratio masse /volume, de sorte que la post-charge demeure constante. La fraction d'éjection reste normale et il n'y a pas de changement significatif dans la consommation d'oxygène par le myocarde. Cependant il y a une augmentation de la résistance coronarienne.

Hypertrophie irrégulière

Chez 14% de patients hypertendus, une hypertrophie cardiaque irrégulière se développe avec asymétrie localisée dans la paroi antérieure, l'apex, la base et le septum. Il y a un épaississement substantiel de la paroi, le ratio masse /volume est considérablement augmenté et la post-charge est diminuée. Les indices de la fonction ventriculaire demeurent dans les limites normales et la consommation d'oxygène du myocarde est normale ou réduite. Comme dans l'hypertrophie concentrique, la résistance coronarienne est augmentée tandis que la réserve coronarienne est réduite.

Hypertrophie excentrique

Avec la persistance d'une haute pression artérielle, accompagnée d'une hypertrophie progressive du myocarde et une prolifération interstitielle de tissus conjonctifs, il peut y avoir des dommages myocardiques menant à une augmentation du rayon ventriculaire, du volume diastolique et de la post-charge. Cette dilatation des ventricules qui en résulte est par définition excentrique. Dans ce type d'hypertrophie, la fraction d'éjection diminue et la consommation en oxygène du myocarde par unité de poids augmente. Tout comme les autres formes d'hypertrophie, la résistance coronarienne est augmentée.

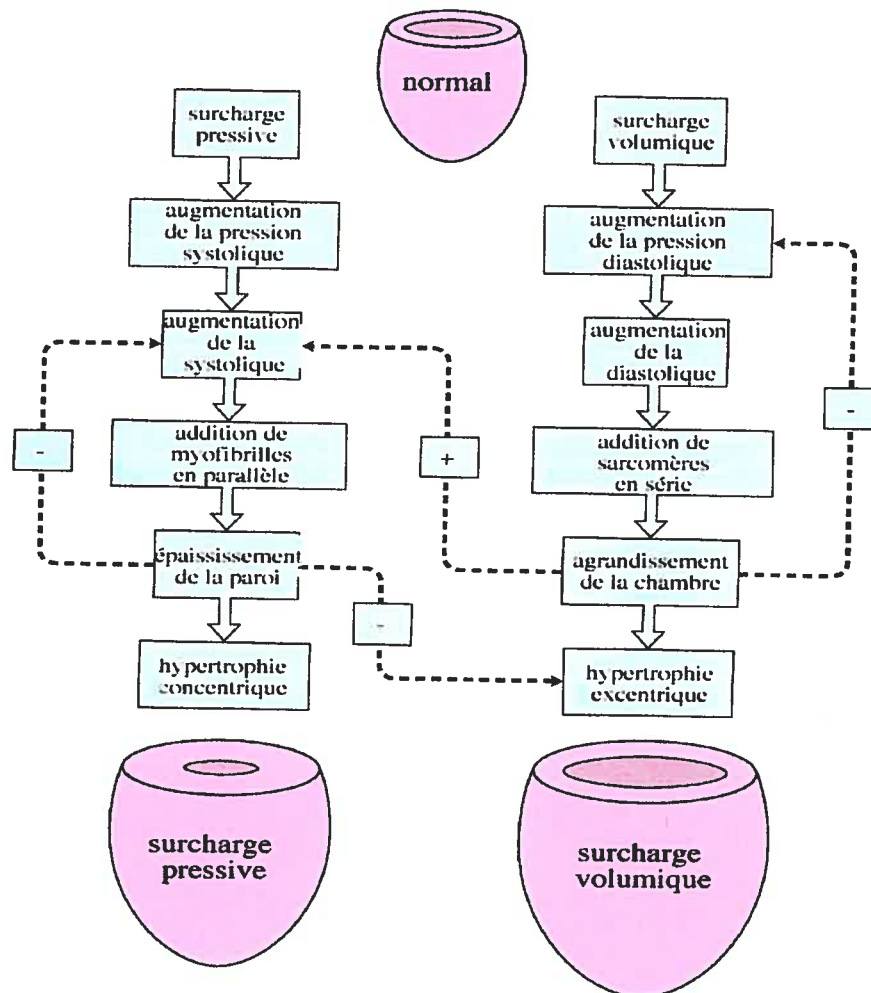


Figure 3 : Représentation des types d'hypertrophie cardiaque dans l'hypertension.

1.2.1.3. Remodelage cardiaque

La croissance des cardiocytes est un dénominateur commun de l'hypertrophie ventriculaire gauche.¹⁰⁰ Le processus hypertrophique est probablement plus que la simple croissance des cardiocytes. L'implication de protéines, d'enzymes ainsi que l'expression de gènes correspondants doivent être considérés dans ce processus. Les hormones circulantes (e.g. hormones de croissance, norepinephrine) sont reconnues pour stimuler la croissance des cardiocytes. De plus, l'étirement mécanique semble jouer un rôle.^{101,102}

La croissance des cardiomyocytes et des non-cardiomyocytes peuvent être des phénomènes contrôlés de façon indépendantes.¹⁰² Des études *in vivo* ont confirmé cette hypothèse en démontrant que l'hypertrophie cardiaque pouvait adopter trois formes différentes :

- 1) une croissance relative des non-cardiomyocytes sans hypertrophie des cardiomyocytes (e.g. fibrose myocardique),
- 2) une hypertrophie relative des cardiomyocytes sans croissance des non-cardiomyocytes (e.g. hypertrophie de l'athlète, anémie chronique, administration d'hormones de croissance),
- 3) une croissance concomitante égale ou disproportionnée de ces deux sous-types de cardiocytes. (e.g. coarctation de l'aorte, l'hypertrophie ventriculaire gauche).

Bref, l'hypertrophie cardiaque implique en général l'hyperplasie de non-cardiomyocytes (essentiellement des fibroblastes) et l'hypertrophie des cardiomyocytes.

Des études portant sur des modèles expérimentaux ont établi des notions sur la base cellulaire du remodelage cardiaque dans l'hypertension.¹⁰¹ Il a été reconnu que les cardiomyocytes entrent en hypertrophie cellulaire (démontré par exemple

par une augmentation significative de leur aire transversale). Cette réponse hypertrophique est en parallèle avec une expression transitoire de proto-oncogènes (e.g. c-myc),¹⁰³ de facteurs de croissance (e.g. l'IGF-1),¹⁰⁴ de même qu'avec l'augmentation de l'expression des isoformes majeurs des protéines contractiles (myosine et actine). Dans le compartiment non-myocytaire, les deux plus importants changements sont la perte de microvaisseaux coronariens ainsi que l'augmentation du collagène du type-I due à la prolifération et/ou l'augmentation de l'activité synthétique des fibroblastes interstitiels.¹⁰¹ En fait, les fibroblastes, comme les cellules endothéliales et les CML sont capables d'entrer dans le cycle cellulaire et peuvent ainsi entrer en mitose ou en croissance hyperplasique. D'un autre côté, le dogme général considère les cardiomyocytes adultes différenciés et donc par définition celles-ci ne prolifèrent pas. Cette vision controversée est cependant remise en question due à des observations contradictoires sur le sujet. La première évidence est le retrait irréversible des myocytes du cycle cellulaire et la seconde documente la mitose de ces cellules. L'observation que la plupart des myocytes se retirent du cycle cellulaire dès la naissance¹⁰⁵ et la difficulté à développer des cultures cellulaires capables de supporter la réplication myocytaire renforcent la notion que tous les myocytes adultes sont différenciés. D'autre part, l'argument contraire en faveur de la réplication myocytaire est l'augmentation du nombre de myocytes et de la masse cardiaque observé par des méthodes morphométriques, cytologiques et biochimiques, au cours du développement normal de la naissance à l'âge adulte chez les animaux et les humains¹⁰⁶. Cependant cette augmentation du nombre de myocytes ne fournit aucun indice sur l'origine de ces cellules. Celles-ci peuvent provenir de cellules précurseur à la lignée myocytaire (e.g. cellules souches adultes), par la réplication de myocytes pré-existantes, ou la combinaison des deux mécanismes. En tous les cas, ceci produit un cadre pour expliquer le renouvellement continu de myocytes en réponse normale ou dans la pathologie

discuté dans la prochaine section et nous oblige à reconsidérer le coeur en tant qu'organe post-mitotique.

1.2.1.3.1. Implication des cardiomyocytes

Lorsque la tension systolique est maintenue élevée au-dessus de la limite normale, le cœur s'adapte rapidement à cette augmentation de la charge par une augmentation de la masse ventriculaire.^{100,107} Même si le principal mécanisme qui relie le travail mécanique à la synthèse protéique est inconnu, durant la phase initiale de l'hypertrophie des cardiomyocytes, de nouvelles isoformes d'actine et de myosine apparaissent séquentiellement^{108,109} et de nouveaux sarcomères s'alignent en parallèle favorisant un épaississement des cardiomyocytes et conséquemment celle de la paroi ventriculaire.¹⁰⁷ Ce processus réduit le stress physique exercé par la haute pression systolique générée au niveau du ventricule gauche mais non du ventricule droit. Ainsi, l'hypertrophie des cardiomyocytes représente une adaptation appropriée à l'augmentation de la pression et du stress exercée sur la paroi ventriculaire gauche. Cependant, cette augmentation de la taille des cardiomyocytes pourrait réduire la diffusion d'oxygène et l'apport de substrats. Des études ultrastructurelles ont démontré des changements délétères des cardiomyocytes comme une diminution de myofibrilles, une augmentation de mitochondries, de myélines et de lipides¹¹⁰ pouvant jouer un rôle important dans la dégénérescence de l'état adaptatif de l'hypertrophie, ce qui peut contribuer à la défaillance cardiaque dont une caractéristique est l'apoptose des cardiomyocytes. Si la dysfonction cardiaque n'est pas présente et le ventricule est hémodynamiquement compensé, l'hypertrophie des myocytes est la forme prédominante de croissance cellulaire et la prolifération des myocytes est négligeable.¹¹¹ Il est à noter que nos études sur la régression thérapeutique portent sur la phase précoce de ce type d'hypertrophie. D'un autre côté, la multiplication des myocytes contribuant à l'hypertrophie cardiaque est l'adaptation majeure des coeurs en défaillance.^{112,113} En effet, les études de

Anversa et al.^{114,115} ont indiqué que l'hyperplasie d'une sous-population de myocytes¹¹⁶ pouvait survenir lors des stades terminaux de la défaillance cardiaque. De même, la perte de myocytes dans la maladie ischémique active la régénération myocytaire et l'hypertrophie qui ensemble contribuent à l'augmentation de la masse musculaire. Il est intéressant à noter que les myocytes peuvent répondre à la surcharge par une réplication cellulaire, l'hypertrophie ou la mort ce qui donne un indice sur leur âge. Les myocytes larges sont vieilles et ne réagissent pas au stimuli de croissance et sont plus susceptibles à la mort. Les myocytes moins grosses s'hypertrophient dans ces conditions et sont moins susceptibles à la mort tandis que les plus petites cellules peuvent encore entrer dans le cycle cellulaire un nombre limité de fois.

1.2.1.3.2. Implication des non-cardiomyocytes

Du point de vue cellulaire, le remodelage hypertrophique du myocarde peut-être un processus homogène ou hétérogène basé sur le fait qu'il peut y avoir une croissance proportionnée ou disproportionnée des non-cardiomyocytes. Lorsque l'homogénéité du tissu est préservée, la proportionnalité des compartiments musculaires, vasculaires et interstitiels est maintenue et l'hypertrophie est jugée *adaptative*. Ceci est le type d'hypertrophie qui se produit en réponse à un entraînement isométrique (comme chez l'athlète). Cette nature adaptative est démontrée grâce à la restauration de la taille du ventricule et de la chambre lorsque la surcharge est corrigée.⁹⁶ En revanche, une disproportion de la croissance des non-cardiomyocytes et la perte subséquente de la proportion inter-compartiment entraîne l'hypertrophie *pathologique*, caractéristique de certains modèles expérimentaux dont le SHR. Dans le cas de l'hypertrophie adaptative, la concentration en collagène du myocarde demeure inchangée même si le contenu en collagène (concentration multipliée par le poids ventriculaire) augmente, tandis qu'une disproportion de la concentration en collagène mène à l'hypertrophie pathologique caractérisée par la fibrose du myocarde. Cette augmentation du

contenu en collagène pourrait refléter une prolifération ou suractivité sécrétoire des fibroblastes interstitiels.

Fibrose du myocarde

Dans le cœur, les fibroblastes interstitiels sont maintenant considérés comme un type cellulaire réactif qui contribuent, du moins dans les conditions pathologiques, à l'organisation de la paroi par des changements dans leur nombre et dans la synthèse de matériaux matriciels. L'accumulation de collagènes fibrillaires et l'augmentation de leur synthèse relativement à leur dégradation sont des indices de la croissance des fibroblastes. Cette production de collagène est impliquée dans la fibrose interstitielle, périvasculaire ainsi que dans la cicatrisation du myocarde suite à l'ischémie.

L'interstitium du myocarde contient des tissus conjonctifs fibrillaires, qui consistent principalement de protéines collagéniques de type I et III. Le collagène de type IV, retrouvé dans les membranes basales et le collagène de type V, un constituant de l'espace périvasculaire, sont présents dans des proportions modestes. Les composantes variées de ce réseau forment un échafaudage qui maintient l'alignement des cardiomyocytes. En fait, le réseau fibrillaire de collagène est un élément essentiel pour le maintien de l'intégrité structurale du myocarde durant la systole et la diastole en dirigeant le stress développé par les sarcomères vers la cavité ventriculaire et distribuant le stress de remplissage diastolique à travers le ventricule.

Le collagène de type I est une composante majeure de la fibrose observée dans l'hypertension rénovasculaire et génétique. Dans l'hypertension humaine et expérimentale avec hypertrophie ventriculaire gauche, l'augmentation de la fraction volumique du collagène peut prendre la forme de fibrose interstitielle, périvasculaire ou de remplacement. Dans les cœurs humains en surcharge de pression (e.g. hypertension, sténose aortique), l'augmentation anormale du

collagène est responsable de l'augmentation de la rigidité myocardique par le développement de la fibrose avoisinant les cardiomyocytes.¹¹⁷⁻¹²⁰ De même, la fonction diastolique est diminuée dû à une réduction de la distensibilité du myocarde. Le mécanisme impliqué dans l'accumulation de collagène menant à la fibrose n'est pas complètement compris, mais cette composante fibrotique semble être bloqué par l'inhibition du SRA tissulaire. L'ischémie a été suggérée comme stimulus additionnel pour la fibrose réparative et réactive.¹²¹⁻¹²³ Des études récentes indiquent que la fibrose du myocarde peut aussi être produit par une élévation chronique d'hormones de croissance comme les minéralocorticoïdes circulantes.

Fibrose du péricarde

Plusieurs études ont démontré que le glissement côte à côte des cardiomyocytes provoque l'amincissement de la paroi ventriculaire ainsi que la dilatation de la chambre.^{124,125} Ce phénomène engendre un déplacement radial des non-cardiomyocytes (fibroblastes) des couches externes vers la région épicaudique du cœur et à ce niveau, ces cellules s'élargissent et s'adaptent à la nouvelle circonférence cardiaque¹²⁶.

Il est connu que le stress exercé sur la paroi ventriculaire cause un changement du phénotype des fibroblastes en myofibroblastes¹²⁷ exprimant le marqueur α -actine des cellules du muscle lisse (α -actine CML). De plus, les myofibroblastes ont une expression augmentée en collagène de type I qui précède la formation du tissu fibreux.¹²⁸ suite à une ligation des coronaires, pericardiotomie, ou lors de la défaillance cardiaque. De plus, ces myofibroblastes expriment l'ECA et produisent de l'AngII. Cette production locale d'AngII dans le tissu fibreux pourrait servir à stimuler la synthèse du collagène de manière autocrine/paracrine. L'épicarde faisant partie intégrante de la plèvre cardiaque est peuplée de cellules mésothéliales positif pour le marqueur VWF (facteur von Willebrand). Les

cellules mésothéliales contribuent grandement à l'expression tissulaire de metalloprotéases matriciels et d'AngII. Cette génération locale régule aussi de manière autocrine/paracrine la synthèse et la déposition de collagène du type I des fibroblastes avoisinants.⁹⁵

Aussi, les cellules mésothéliales modulent le phénotype des cellules en co-culture en augmentant leur expression en α -actine CML¹²⁹ ce qui pourrait représenter un processus supplémentaire dans le contrôle de la fibrose péricardique durant les stades avancés de l'hypertrophie menant à la défaillance cardiaque.

1.2.1.3.3. Altération de la microcirculation coronarienne

Les patients souffrant d'hypertension artérielle sont souvent angineux et possèdent des signes cliniques d'ischémie myocardique pendant un test de tolérance à l'exercice.^{130,131} Chez ces patients, la réserve coronarienne vasodilatatrice est fréquemment altérée. Un réarrangement ou remodelage du matériel dans la paroi telles les fibres du muscle vasculaire lisse augmente l'épaisseur de la paroi artériolaire réduisant le diamètre luminal.¹³² Il semblerait aussi que les changements de l'interstitium périvasculaire pourraient altérer la capacité vasodilatatrice coronarienne et induire une détérioration de la microcirculation coronarienne dans l'hypertension indépendamment de l'hypertrophie des cardiomyocytes. Suite à une persistance de haute pression, des dommages cellulaires parenchymaux et la perte de myocytes surviennent, ce qui mène inévitablement à la fibrose et la cicatrisation. L'augmentation des matériaux rigides dans l'interstitium périvasculaire de même que l'augmentation des forces de compression cardiaques (e.g. élévation de la pression diastolique) provoquent l'altération de la vasodilatation maximale. De plus, la réduction du nombre d'embranchements vasculaires serait un mécanisme additionnel contribuant à l'augmentation de la résistance et à la perte d'efficacité de la microcirculation.¹³³

Cependant, des études démontrent que la densité capillaire ne serait pas réduit chez des SHR recevant des inhibiteurs du SRA^{134,135} et pourrait toutefois être augmenté dans certains cas par le traitement à long-terme avec de faibles doses d'iECA.¹³⁶

1.2.2. Le système vasculaire

1.2.2.1. Structure vasculaire

La paroi d'une artère normale est constituée de trois couches concentriques qui sont allant de l'extérieur vers la lumière : l'adventice, la média et l'intima.

- 1) L'adventice reçoit les terminaisons nerveuses à l'origine de la vasomotricité. Elle est principalement constituée de fibroblastes, disposés tous entre des fibrilles de collagène et de protéoglycans.
- 2) La média représente la couche principale de l'artère constitué principalement de CML qui déterminent le tonus vasculaire et entourés d'une matrice extracellulaire constitué de fibrilles de collagène de type I et III, de fibronectine, de fibres élastiques et de protéoglycans.
- 3) L'intima dans les artères normales est formé essentiellement d'une monocouche de cellules endothéliales tapissant l'intérieur du vaisseau. L'endothélium occupe des fonctions primordiales d'une part en présentant une surface non-thrombogénique afin d'empêcher l'hémostase et d'autre part, l'endothélium est le siège d'une activité métabolique intense qui se traduit par la synthèse et la libération de nombreux médiateurs. Dans l'athérosclérose, il est à noter la présence de CML intimaux.

1.2.2.2. Pathophysiologie dans l'hypertension

Comme le cœur, le système vasculaire ne peut être considéré comme un tissu quiescent avec une structure fixe. Les vaisseaux sanguins sont capables de remodeler leur architecture en réponse à des stimuli spécifiques et des conditions tel l'augmentation chronique de la tension artérielle. Les deux anomalies

fonctionnelles du système vasculaire dans l'hypertension sont la diminution de l'étendue des réseaux artériels et veineux et l'augmentation de la résistance au flot sanguin.

La réduction de la compliance de l'arbre vasculaire dans l'hypertension est due aux changements structuraux des grosses artères (e.g. aorte) et des veines, alors que l'augmentation de la résistance est localisée dans les petites artères et dans la micro-circulation. Les principaux changements structuraux mieux connus sous le terme de *remodelage vasculaire* peuvent se traduire par une hypertrophie, hyperplasie ou polyploïdie cellulaire et/ou une réorganisation de la paroi.

1.2.2.3. Remodelage vasculaire

L'augmentation du ratio média /lumière a souvent été interprétée comme synonyme de la croissance. Or, ce n'est pas nécessairement le cas car cette augmentation du ratio peut survenir par réarrangement des structures cellulaires ainsi que leurs composantes pré-existantes sur le coté abluminal ou luminal du vaisseau sans nécessairement invoquer une réponse de croissance. Ce processus de réarrangement avec ou sans croissance cellulaire est défini comme étant le remodelage. Le remodelage vasculaire implique des altérations structurales adaptatives des vaisseaux sanguins qui se produisent généralement en réponse aux changements chroniques de conditions hémodynamiques inadaptés. Ce remodelage peut subséquentement contribuer à la pathologie de la maladie vasculaire et aux désordres du système circulatoire.

Le processus de remodelage implique des changements dans un ou plusieurs des évènements cellulaires suivants : la croissance, la mort ou la migration cellulaire, de même que la production ou dégradation de la matrice extracellulaire. Ces processus dépendent de l'interaction dynamique entre les facteurs de croissance générés localement, les substances vasoactives, les stimuli hémodynamiques et

l'état oxydatif vasculaire. Selon une vision plus générale, le remodelage vasculaire comprend :

- 1) la disparition (raréfaction) et la croissance de nouveaux vaisseaux (angiogénèse),
- 2) le changement dans le nombre ou la taille des CML vasculaires,
- 3) l'altération dans la composition de la matrice extracellulaire de la paroi, affectant ainsi la compliance vasculaire.

Plusieurs facteurs peuvent causer une réduction de la compliance : l'augmentation du tonus vasculaire, l'augmentation de l'épaisseur de la paroi vasculaire, les altérations dans la composition en matrice extracellulaire, ainsi que l'augmentation du nombre de cellules affectant la masse de l'organe. L'augmentation de la masse d'un organe peut être dû à l'hypertrophie cellulaire (augmentation de la taille cellulaire et du contenu en protéine, sans augmentation du contenu en ADN), à l'hyperplasie cellulaire (augmentation du nombre cellulaire et du contenu total en ADN), ou une co-existence des deux phénomènes.

L'interprétation générale du remodelage vasculaire se complique par l'hétérogénéité marquée du système vasculaire. Deux principaux types de remodelage ont été identifiés dans les modèles expérimentaux et chez l'humain: un remodelage où intervient une croissance cellulaire dite *hypertrophique* qui est caractéristique des grosses artères et un remodelage où n'intervient aucune croissance cellulaire dite *eutrophique*, caractéristique des petites artères.

1.2.2.3.1. Remodelage hypertrophique (grosses artères)

L'anomalie structurelle majeure des gros vaisseaux dans l'hypertension est l'hypertrophie des CML avec augmentation subséquente de l'épaisseur de la paroi vasculaire.¹³⁷⁻¹³⁹ L'hypertrophie des CML de l'aorte ainsi que celles de plusieurs autres grosses artères est généralement vu comme un changement

adaptatif à la progression de la maladie hypertensive.¹³⁹ Elle peut être accompagné de polyploïdie (augmentation du contenu en ADN sans division cellulaire) des CML, un processus qui semble être uniquement présent dans les grosses artères et qui augmente avec l'âge dans les modèles expérimentaux d'hypertension dont le SHR ainsi que chez l'humain. L'augmentation de l'épaississement de la paroi vasculaire en réponse à une élévation de la pression artérielle tend à être de nature protectrice permettant la normalisation de la tension pariétale. Par contre, chez le SHR, l'hypertrophie des CML dans les artères carotidiennes et les artères rénales principales précède le développement de l'hypertension. En fait, l'augmentation de la résistance vasculaire rénale chez le SHR précède les anomalies de tout autre lit vasculaire¹⁴⁰ et les cellules de ces artères en culture démontrent la plus grande sensibilité à la croissance.¹⁴¹

Un autre aspect du remodelage vasculaire dans l'hypertension est l'augmentation de la synthèse des composantes de la matrice extracellulaire. La matrice extracellulaire de la paroi artérielle est un système intégré composé de fibrilles de collagène, de lamelles élastiques, de protéoglycans et de glycoprotéines structuraux qui ensemble avec les cellules déterminent les propriétés majeures de la paroi du vaisseau. De ce fait, plusieurs métalloprotéases matriciels (MMP : enzymes impliquées dans les processus de réparation tissulaire, migration cellulaire¹⁴² et dans la régulation de la composition et du contenu de la matrice extracellulaire¹⁴³ dont MMP-1, -2, -3 et -9, sont produites dans les vaisseaux et leur expression est augmentée dans différentes formes d'hypertension. Dans l'hypertension essentielle, la synthèse de fibres élastiques et de collagène est augmenté. Ces changements, secondaires à la haute pression artérielle, contribuent de façon importante à la diminution de la distensibilité des artères. Chez les patients hypertendus, l'épaississement de la paroi vasculaire a lieu dans les grosses artères, probablement suite à l'hypertrophie des CML.

1.2.2.3.2. Remodelage eutrophique (petites artères)

L'augmentation chronique de la tension artérielle est associée à des modifications de la structure des petites artères de résistance (ratio média/lumière augmenté ou remodelage). Même si cette association est au centre d'une controverse depuis des dizaines d'années, il semble que cette adaptation vasculaire ne soit pas la cause mais plutôt une conséquence de l'hypertension. Les travaux de Folkow et Mulvany ont démontré que même les augmentations transitoires de la pression artérielle induisent le remodelage pathologique. D'une manière ou d'une autre, ce remodelage vasculaire pourrait contribuer au maintien d'une tension artérielle élevée et de plus, considérant le nombre d'organes atteints par l'hypertension, il est vraisemblable qu'un contributeur commun, tel le remodelage vasculaire, puisse nuire à la fonction des organes cibles d'une manière généralisée. De fait, le remodelage des petites artères pourrait favoriser ces dommages en restreignant l'irrigation sanguine des organes dans des périodes de demande accrue ou lorsque les réserves des tissus déclinent graduellement, par exemple avec l'âge.

La nature de ce changement structurel des petites artères dans l'hypertension a été revue par plusieurs auteurs.^{144,145} Les études histologiques ont montré que le rapport média/lumière des petites artères est augmenté à différents stades du développement de l'hypertension clinique et expérimentale. L'augmentation du nombre de CML de différents petits vaisseaux est due à l'élévation de la synthèse d'ADN des CML et l'hyperplasie subséquente plutôt que l'hypertrophie tel que décrite dans les grosses artères.^{138,145} Dans les modèles primaires d'hypertension, l'hyperplasie des CML des petites artères représente un évènement précoce dans le développement de l'hypertension, contrairement à ce qui a été décrit pour le remodelage des grosses artères.^{138,145} Cependant, ces observations pour les petites artères sont sujettes à de grands débats.¹³⁸

Dans les artères mésentériques de jeunes SHR, la taille des CML, le contenu protéique de même que la prévalence des cellules polyploïdes ne sont pas différents des artères de rats WKY.^{138,145} Par ailleurs, chez les SHR âgés de 6 semaines, il y a une augmentation remarquable de synthèse d'ADN dans les petites artères.¹⁴¹ Cette prolifération exagérée des CML vasculaires de SHR persiste en culture sans l'influence de la pression sanguine, suggérant l'existence d'une défectuosité génétique intrinsèque dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Cependant, dans des modèles d'hypertension secondaire (e.g. Goldblatt, DOCA-sel, coarctation aortique), l'augmentation de l'épaisseur de la média des petits artères est causée par l'hypertrophie de CML plutôt que l'hyperplasie^{138,146} suggérant que ces changements structuraux sont un phénomène d'adaptation secondaire à l'augmentation de la pression artérielle. De toute manière, l'hypertrophie et/ou l'hyperplasie des CML participe à l'augmentation de la masse vasculaire, ainsi qu'à l'augmentation de la synthèse des composantes de la matrice extracellulaire tel le collagène, l'élastine, les protéoglycans et la fibronectine.

1.2.2.3.3. Implication des espèces réactives d'oxygène

Le dommage vasculaire dans l'hypertension est associé à la production accentuée de ROS et d'AngII.^{147,148} Le stress oxydatif stimule l'hypertrophie et la prolifération des CML, altère la fonction des MMP et augmente le dépôt de collagène ce qui engendre l'épaississement de la paroi vasculaire et le remodelage artériel. Les ROS augmentent aussi la perméabilité endothéliale laissant ainsi traverser des protéines plasmatiques, diverses macromolécules ce qui entraîne le recrutement de cellules immunitaires et engendre le processus inflammatoire aggravant la dysfonction endothéliale et le dommage vasculaire. Plusieurs de ces changements dépendantes du statut rédox dans l'hypertension sont aussi présentes dans les vaisseaux athérosclérotiques et de ce fait le stress oxydatif pourrait constituer une composante commune qui relierait ces deux maladies.^{149,150} En

plus de la multitude d'études suggérant la contribution de la dysfonction endothéliale au remodelage vasculaire,¹⁵¹ l'épaississement même de la paroi influence le statut redox des vaisseaux en augmentant la distance de diffusion de l'oxygène luminal. Ainsi, une diminution de la diffusion de l'oxygène mène à une plus grande concentration de ROS qui elle contribue à son tour à exacerber le stress oxydant, la croissance des CML, la dysfonction endothéliale et le dommage vasculaire dans l'hypertension.¹⁶ Nous discuterons plus en détail des espèces réactives d'oxygène et du stress oxydatif et à la section 1.3.4.6..

1.2.3. Pharmacothérapie du remodelage

Les médicaments antihypertenseurs ont non seulement le pouvoir de réduire la pression artérielle mais aussi d'altérer la structure cardiovasculaire atteinte d'un déséquilibre de la croissance. Ces agents dits « antiprolifératifs » peuvent inhiber ou même corriger l'hypertrophie cardiovasculaire. Cette *pharmacothérapie du remodelage* a comme objectif de normaliser les variables cardiovasculaires atteintes dans l'hypertension en interférant avec les médiateurs du remodelage. Plusieurs classes d'agents antihypertenseurs influencent le remodelage en ciblent spécifiquement d'une part la perte irréversible des cardiomyocytes du ventricule et des CML des petites artères, et d'autre part le déséquilibre prolifératif des fibroblastes interstitiels et de l'adventice responsable de la déposition de la matrice extracellulaire dans le cœur et les vaisseaux respectivement. Il faut savoir que tous les antihypertenseurs ne possèdent pas la même efficacité dans la correction des paramètres physiologiques lésés dans la pathologie cardiovasculaire.

1.2.3.1. Effets cardiaques

Étant donné que l'hypertrophie ventriculaire gauche, la baisse de perfusion coronarienne et la fibrose du myocarde sont des complications manifestés dans la maladie hypertensive, le traitement médical devrait cibler la normalisation de ces paramètres qui sont souvent aussi dangereuses que la haute pression même. Ainsi,

la prévention ou la régression de l'hypertrophie ventriculaire, l'amélioration de la réserve sanguine et la diminution de la fibrose sont des objectifs convoités.

Des études cliniques ont démontré que certaines thérapies antihypertensives peuvent mener à la régression de l'hypertrophie ventriculaire conjointement avec la réduction de la pression sanguine. Parmi les premières études de ce genre, les thérapies avec des iECA,¹⁵² des bloqueurs calciques^{153,154} et la combinaison α -méthyldopa - diurétique¹⁵⁵ ont démontré des effets positifs à cet égard. Des résultats hétérogènes ont été obtenus avec les antagonistes β -adrénergiques¹⁵⁶ pouvant s'expliquer par l'activité sympathomimétique de certains agents dans cette classe. Par exemple, acebutolol, un antagoniste β -adrénergique avec une activité sympathomimétique intrinsèque n'induit pas la régression de l'hypertrophie cardiaque tandis que l'aténolol ne possédant pas cette activité semble avoir un effet positif sur la régression.¹⁵⁷ Cette hétérogénéité de la réponse antihypertrophique s'étend aussi à d'autres classes. Étant donné que les diurétiques et vasodilatateurs ont la capacité d'activer certains facteurs de croissance dont l'AngII et les catécholamines,¹⁵⁸⁻¹⁶¹ l'impact de ces drogues sur l'hypertrophie ventriculaire demeure non établi. De même, le traitement chronique aux diurétiques^{96,162} et aux vasodilatateurs artériels tel l'hydralazine ou le minoxidil^{163,164} n'induit pas la régression de l'hypertrophie cardiaque même si elles diminuent la pression chez les patients. Donc, même si l'efficacité des divers traitement pharmacologique dans la diminution de l'hypertension est bien établie, on ne peut toutefois pas tirer des conclusions sur l'efficacité qu'ont ces divers médicaments sur la correction des paramètres cardiovasculaires telle l'hypertrophie. À ce sujet, une récente méta-analyse de résultats provenant de bases de données d'études cliniques (à double-insu, randomisées etc.) a démontré que les iECA sont les plus efficaces, suivis des antagonistes des canaux calciques

tandis que les diurétiques et les β -bloqueurs étaient moins efficaces¹⁶⁵ dans la régression de l'hypertrophie du ventricule gauche.

Les médiateurs chimiques du remodelage cardiaque les mieux compris appartiennent au SRA. Deux facteurs ont contribué à nos connaissances actuelles sur le rôle du SRA : premièrement, la disponibilité de plusieurs agents pharmacologiques influençant ce système, et deuxièmement les effets remarquables de ces médicaments sur le remodelage cardiaque dans les modèles expérimentaux et dans les pathologies humaines. Il semble maintenant que le SRA joue un rôle important dans le processus du remodelage cardiaque qui se manifeste souvent d'une fibrose du myocarde. La réponse fibreuse tissulaire de l'interstitium cardiaque est responsable de la rigidité anormale du muscle et du dysfonctionnement ventriculaire diastolique en particulier. Chez les patients souffrant de cette condition, la régression de la structure du myocarde et la restauration de la distensibilité représentent des objectifs thérapeutiques intéressants, avec l'AngII circulante et l'aldostérone comme cibles logiques pour traitement. Initialement, des études dans des modèles d'ischémie rénale ou d'hyperaldostéronémie de la fibrose tissulaire ont démontré une atténuation de la morbidité avec le traitement au spironolactone et au captopril, faisant ainsi preuve des propriétés cardioprotectives de ces médicaments. Étant donné l'importance du calcium en tant que médiateur intracellulaire de la réponse à l'AngII pour la synthèse de collagène des fibroblastes, les bloqueurs des canaux calciques pourraient aussi posséder des propriétés cardioprotectives. En plus d'avoir des effets protecteurs contre la fibrose du myocarde, les effets bénéfiques des iECA et des antagonistes AT_1 de l'AngII ont également été démontrés dans l'atténuation de la formation du tissu fibreux au site d'infarctus, dans le péricarde post-pericardiectomie et dans des modèles expérimentaux de fibrose péricardique post-opératoire.^{128,166,167}

1.2.3.2. Effets vasculaires

L'hypertrophie vasculaire sert de processus d'adaptation à la haute tension artérielle, impliquant de ce fait la normalisation des variables physiques impliquées dans la morbidité comme objectif de la pharmacothérapie.¹⁶⁸⁻¹⁷⁰

Le remodelage vasculaire pathologique est observé comme une augmentation du rapport paroi sur la lumière ; celle-ci est définie comme un changement de la distribution des CML autour d'une plus petite lumière avec ou sans augmentation du contenu en ADN. Au niveau des petites artères musculaires, l'hypertrophie vasculaire accompagnée d'une hypertrophie ou d'une hyperplasie des CML amplifie la résistance vasculaire et la pression artérielle.^{171,172} Au niveau de l'aorte et ses principaux enbranchements, l'augmentation de la masse et de la rigidité de la paroi artérielle contribuent à l'hypertension systolique et représentent des facteurs de risque du développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche.¹⁷³

La régression de l'hypertrophie artérielle dans l'hypertension expérimentale est influencée premièrement par une baisse de la tension avec le traitement chronique aux antihypertenseurs.¹⁷⁰ Cependant, il existe des exceptions à cette règle générale supportées par le minoxidil et l'hydralazine qui elles produisent dans certaines instances un effet antihypertrophique décevant face à une baisse de pression jugée acceptable. La régression de l'hypertrophie causée par ces agents lorsque combinée avec un agent sympatholytique suggère que les vasodilatateurs artériels augmentent l'activité sympathique de même que celle du SRA. D'un autre côté, il y a des médicaments tels les antagonistes calciques et les agents interférant avec le SRA qui influencent la structure vasculaire par des mécanismes indépendants de la baisse de la pression artérielle.

Une variété de facteurs de croissance, incluant le PDGF et l'AngII, stimulent l'influx calcique, du moins en partie à travers les canaux de type L dans les CML quiescentes.^{174,175} L'augmentation conséquente du calcium intracellulaire semble jouer un rôle vital dans la migration et la prolifération des CML.¹⁷⁶ Les antagonistes des canaux calciques de type L sont des inhibiteurs puissants pour la migration et la prolifération des CML ;¹⁷⁷ un effet qui semble être dissocié de la classe chimique^{174,175,177} Cependant ceci est un sujet de controverse car même avec une réduction efficace de la pression, les antagonistes calciques ont des effets anti-athérogéniques modestes¹⁷⁸ et ne produisent pas une réduction nette de l'hypertrophie de la média des artères de résistance au delà du niveau attendu.^{145,179}

L'AngII est impliqué dans l'angiogénèse et la raréfaction vasculaire, la croissance des CML, et la synthèse de la matrice extracellulaire. Des observations indirectes du rôle de l'AngII comme facteur de croissance des CML proviennent des études avec les bloqueurs du SRA, démontrant par exemple la diminution de l'hypertrophie des grosses artères durant un traitement chronique des rats SHR au captopril.¹⁸⁰ Des études ultérieures ont confirmé cette observation avec d'autres iECA dans différents modèles d'hypertension.¹⁸¹ Les iECA peuvent atténuer l'hypertrophie des grosses et petites artères durant le développement spontané de l'hypertension chez le rat et peuvent aussi diminuer l'hypertrophie existante dans les formes établies d'hypertension expérimentale. En effet, le traitement chronique des SHR aux iECA réduit l'aire de section des artères de différents lits vasculaires incluant les artères mésentériques, les artères cérébrales et les artères coronariennes.^{180,182-186} Cependant une hétérogénéité dans la réponse aux iECA est rapporté avec le cilazapril, qui produit une régression de l'hypertrophie de façon plus marquée dans les grosses artères que dans les petits vaisseaux,¹⁸³ et le captopril qui diminue l'hyperplasie des CML dans les artères mésentériques

supérieures mais pas dans celles des plus petites artères.¹⁸² Dans les CML en culture¹⁸⁷ et dans les cultures cellulaires de petites artères,¹⁸⁸ les iECA n'ont pas d'effet sur la prolifération induite par différents stimuli. Aussi, il a été rapporté que les iECA et les antagonistes AT₁ inhibent la formation de petits vaisseaux en situation d'ischémie.^{189,190}

1.2.3.2.1. Correction de la dysfonction endothéliale

Plusieurs évidences démontrent que le stress oxydatif médie le dommage vasculaire dans diverses pathologies dont l'hypertension, l'athérosclérose et l'ischémie-réperfusion. Ceci évoque le concept de la correction de la dysfonction endothéliale en tant qu'objectif thérapeutique.

Il est clairement démontré qu'un des effets majeurs de l'AngII sur les récepteurs AT₁ réside dans l'activation de la NADPH oxydase membranaire et dans la production accrue d'anion superoxyde. L'augmentation du stress oxydatif induit par l'AngII contribue vraisemblablement au développement des complications reliés à l'activation du SRA. Conséquemment, les effets bénéfiques des bloqueurs du SRA sur le système cardiovasculaire pourraient donc être médiés en partie par leur propriétés antioxydantes associés au blocage du stress oxydatif induit par l'AngII. En fait, la dysfonction endothéliale aortique et cardiaque chez le SHR est corrigé suite au traitement antihypertenseur avec des iECA et des antagonistes du récepteur AT₁¹⁹¹⁻¹⁹³ mais pas avec certains vasodilatateurs.¹⁹⁴

Le rôle du stress oxydatif dans le remodelage a aussi été suggéré dans des études démontrant que les vitamines antioxydants augmentent l'aire luminale et permettent la régression du remodelage artériel dans des coronaires de modèles expérimentaux.¹⁹⁵ Vu que la dysfonction endothéliale est le plus souvent retrouvé dans les petites artères et les embranchements vasculaires, il est raisonnable d'assumer que ces vaisseaux démontreront des anomalies

physiologiques bien avant la manifestation des changements drastiques dans la pression-pulsatile et dans la perte de distensibilité aortique associée avec les stades avancés de l'athérosclérose et la vieillesse. La supplémentation en chronique de vitamines antioxydantes devrait donc être considérée en terme de médecine préventive pour le remodelage.

1.3. ANGIOTENSINE II DANS LE SYSTÈME CARDIOVASCULAIRE

1.3.1. Biosynthèse d'angiotensine II

Tel que nous l'avons décrit précédemment, le SRA est décrit classiquement comme un système endocrinien où les peptides sont synthétisés en cascade dans la circulation systémique.⁶ Brièvement, le SRA joue un rôle important dans la régulation de la pression en grande partie via l'action de son effecteur clé l'AngII qui est produit par les réactions enzymatiques successives de la rénine et de l'ECA à partir de l'angiotensinogène biologiquement inactif (voir Figure 1, section 1.1.2.3.1.).

1.3.1.1. Systèmes tissulaires et voies alternatives de synthèse

La recherche sur le SRA au cours des vingt dernières années a permis de mettre en évidence que la production de l'AngII dépend non seulement de la circulation systémique mais qu'elle peut aussi être générée localement dans divers tissus. L'existence d'un système tissulaire indépendant du système circulant signifie que certains tissus possèdent toutes les composantes nécessaires à la génération locale d'AngII. En fait, l'expression de l'angiotensinogène et de la rénine a été démontrée entre-autre dans le rein, la glande surrénale, le tissu adipeux, le cœur et les vaisseaux sanguins.⁶ En plus de sa prédominance dans les cellules endothéliales, l'ECA est aussi exprimée dans les CML vasculaire et les fibroblastes.

Bien que la rénine et l'ECA représentent les enzymes classiques du SRA, des voies alternatives peuvent aussi produire de l'AngII à partir de l'angiotensinogène, sous l'influence notamment de la cathepsine G, l'élastase, la tonine, l'activateur du plasminogène tissulaire (tPA : « tissue plasminogen activator ») et l'enzyme génératrice de l'AngII sensible à la chymostatine (CAGE : « chymostatin-sensitive angiotensin II generating enzyme »).^{196,197} Ces mécanismes additionnels pourraient potentiellement servir à l'amplification de la réponse vasculaire aux sites d'inflammation contribuant à la régulation du flot sanguin local. De plus, CAGE semble jouer un rôle déterminant dans le système cardiovasculaire durant des conditions pathologiques comme les maladies coronariennes.

1.3.2. Types de récepteurs associés et distribution tissulaire

Le développement de nouveaux antagonistes des récepteurs de l'AngII a mené à la caractérisation de différents sous-types de récepteurs. La population qui est inhibée par le losartan est désignée AT₁, tandis que celle qui est bloquée par le composé PD123177 a été désignée AT₂. Les récepteurs AT₃ et AT₄ à l'AngII ont également été décrits. Par contre la pharmacologie de ces récepteurs demeure encore controversée et pas entièrement caractérisée. Les récepteurs AT₃ et AT₄ ne sont pas actuellement inclus dans la classification définitive des récepteurs de l'AngII tels que défini par l'« International Union of Pharmacology Nomenclature Subcommittee for Angiotensin Receptors ».

Des études de radio-liaison ont permis d'évaluer la distribution tissulaire des récepteurs AT₁ et AT₂. Le sous-type AT₁ est retrouvé abondamment dans tous les tissus adultes du système cardiovasculaire, rénal, endocrinien et nerveux chez l'humain. Par contre, le récepteur AT₂ est exprimé préférentiellement dans les tissus fœtaux et son expression décline rapidement après la naissance. Chez l'adulte, l'expression du récepteur AT₂ est principalement limitée au niveau du pancréas, du cœur, des reins, du cerveau et de l'endothélium vasculaire. Les

niveaux d'expression des récepteurs AT_1 et AT_2 sont altérés dans diverses pathologies dont l'hypertension artérielle. En effet, dans le cœur hypertrophié de rat, le ratio de la densité de récepteurs AT_2 par rapport aux récepteurs AT_1 est significativement augmenté.¹⁹⁸

1.3.2.1. Les récepteurs AT_1

La pharmacologie des antagonistes des récepteurs AT_1 a été revue par Timmermans et ses collaborateurs.⁷ Les récepteurs AT_1 sont responsables de la majorité des effets physiologiques de l'AngII connus jusqu'à présent soient les effets sur la vasoconstriction, la réabsorption sodique, la sécrétion d'aldostérone, la stimulation sympathique, la soif, la croissance cellulaire et la libération d'AVP. Le récepteur AT_1 appartient à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires associés aux protéines G. Cette famille de récepteurs active la PLC à travers la protéine hétérotrimérique G_q et peut aussi médier des signaux à travers d'autres protéines G dont G_i , $G_{11/13}$ ou G_s . Le récepteur AT_1 est couplé à plusieurs systèmes effecteurs dont l'adénylate cyclase, les canaux calciques et les phospholipases (PL) B, C, D et A_2 .

Au niveau du système cardiovasculaire où le récepteur AT_1 est exprimé abondamment, divers groupes ont démontré une distribution du récepteur selon le type cellulaire. En effet dans les vaisseaux humains, on retrouve des niveaux élevés du récepteur AT_1 dans la média qui est composé essentiellement de CML, alors que seulement de très faibles niveaux de ce récepteur sont exprimés dans l'adventice qui est composée de fibroblastes. La présence de récepteurs AT_1 sur les cellules endothéliales aortiques de rats a également été démontrée. Au niveau du cœur, l'expression des récepteurs AT_1 a été démontrée à la fois dans les cardiomyocytes et les fibroblastes. Par contre, ce profil d'expression cardiaque du récepteur AT_1 est altéré dans la pathologie telle la défaillance cardiaque où les quantités du récepteur sur les cardiomyocytes sont réduites de façon importante.

Outre les effets physiologiques de l'AngII médié par le récepteur AT_1 , d'autres effets d'ordre pathophysiologique ont également été décrits. Ceux-ci incluent la stimulation de la production de ROS, l'induction du processus inflammatoire, thrombotique et fibrotique. Il a été suggéré que ces effets pathophysiologiques médiés par le récepteur AT_1 impliquent l'activation du facteur de transcription nucléaire NF- κ B.^{199,200}

1.3.2.2. Les récepteurs AT_2

Contrairement au récepteur AT_1 , les propriétés structurales et fonctionnelles du récepteur AT_2 sont moins bien connues. Cependant, des évidences récentes suggèrent que le récepteur AT_2 joue un rôle au niveau de la régulation de la pression sanguine et de la fonction rénale en contrebalançant les actions vasoconstrictrices et antinatriurétiques de l'AngII. Plusieurs évidences démontrent que les effets cardiovasculaires du récepteur AT_2 opposent celles du récepteur AT_1 (voir section 1.3.3.). En général, l'AngII via le récepteur AT_2 a des effets anti-prolifératifs, pro-apoptotiques et vasodilatateurs. Cependant, ces effets ne sont pas catégoriques car il y a aussi des évidences qui soutiennent des effets inverses médiés par les récepteurs AT_2 dont la vasoconstriction dans les artères mésentériques chez le jeune SHR.²⁰¹

Comme le récepteur AT_1 , le récepteur AT_2 est un récepteur à sept domaines transmembranaires associé aux protéines G. Par contre, la cascade de signalisation et les mécanismes d'association des protéines G lors de l'activation du récepteur AT_2 sont atypiques. Des études ont démontré que selon le type cellulaire et la voie de signalisation étudiée, les récepteurs AT_2 sont associés aux protéines $G_{\alpha i2}$ et $G_{\alpha i3}$.

Le récepteur AT_2 médie ses effets physiologiques principalement à travers trois voies de signalisation intracellulaires dont la déphosphorylation des protéines via l'activation de phosphatases, la régulation de la voie NO-GMPc (guanosine 5'-monophosphate cyclique) et la relâche de l'acide arachidonique via la stimulation de la PLA_2 . Enfin, il a été démontré que des effets inflammatoires associés à l'induction de NF- κ B ainsi que des effets trophiques entraînant l'hypertrophie cardiovasculaire sont associés à l'activation des récepteurs AT_2 . Ces dernières observations démontrent la complexité et nos connaissances limitées du système des récepteurs à l'Ang II.

1.3.3. Effets physiologiques de l'angiotensine II

Le SRA circulant est impliqué dans les effets aigus de l'AngII comme la vasoconstriction, l'homéostasie hydro-sodée, la sécrétion d'aldostérone et la contractilité cardiaque. Le SRA tissulaire semble plutôt être responsable des effets à long terme dont la croissance et la différenciation cellulaire impliquées dans le processus d'hypertrophie cardiovasculaire. Les rôles physiologiques de l'AngII apparaissent ainsi très importants et diversifiés chez l'humain.^{6,196,197}

Tableau I : Effets physiologiques de l'AngII via les récepteurs AT_1 et AT_2

AT_1	AT_2
Vasoconstriction Prolifération cellulaire Hypertrophie cellulaire Anti-natriurèse Production de superoxide Progression de la matrice vasculaire Expression des molécules d'adhésion Sécrétion d'endothéline Péroxidation des lipides	Vasodilatation Apoptose Inhibition de la croissance cellulaire Natriurèse Production de NO Synthèse de collagène

1.3.4. Effets moléculaires et cellulaires de l'angiotensine II

1.3.4.1. Effets sur la croissance cellulaire

Le remodelage cardiovasculaire dans l'hypertension est associé à une croissance anormale des CML vasculaires et des fibroblastes cardiaques.²⁰² La croissance exagérée des cellules est médiée à travers la stimulation du récepteur AT₁ qui entraîne l'activation de divers effecteurs dont les protéines de la famille des kinases MAPK ("Mitogen Activated Protein Kinases"); soit ERK, JNK et p38. La modulation de l'activité de ces kinases joue un rôle primordial dans la contraction, la différenciation, la prolifération et l'apoptose cellulaire ainsi que dans l'expression de différents gènes. Dans les CML vasculaires en culture, la stimulation des récepteurs AT₁ par l'AngII active ERK,^{203,204} JNK²⁰⁵ et plus moindrement p38.^{206,207} De plus, cette stimulation des récepteurs AT₁ provoque une augmentation rapide de l'expression de l'ARN messenger des proto-oncogènes c-myc, c-fos et c-jun et de la transcription de plusieurs facteurs de croissance dont bFGF,^{208,209} PDGF,²¹⁰ TGF- β ,^{208,211} IGF,²¹² et VEGF.²¹³ Ces réponses sont associés à l'hypertrophie des CML vasculaires et des cardiomyocytes.^{214,215}

Au cours du développement de l'hypertension artérielle, des études chez le rat ont démontré une augmentation de l'activité ERK et JNK dans l'aorte associée à une augmentation de la masse.²¹⁶ D'autres études ont démontré que l'antagonisme des récepteurs AT₁ par le losartan atténue significativement l'augmentation de l'activité ERK et JNK dans ce modèle.²¹⁷ Malgré une normalisation similaire de la pression à celle du losartan, la nifédipine ne réduit pas aussi efficacement l'activité de ces kinases.²¹⁷ Ces résultats suggèrent que la modulation de l'activité de ERK et JNK dans les vaisseaux de rats hypertendus est associée aux récepteurs AT₁ et partiellement dissociée de l'effet presseur.

Dans un modèle d'hypertension rénovasculaire, une incidence élevée de cellules polyploïdes a été observé dans la média aortique, suggérant que les niveaux plasmatiques élevés d'AngII associés à ce modèle entraînent la synthèse d'ADN dans les CML vasculaires.²¹⁸ De plus, des études chez le SHR ont démontré que le captopril réduit à la fois le volume des CML vasculaires et le nombre de cellules polyploïdes aortiques.²¹⁹ Dans ce même modèle, l'AngII entraîne aussi des effets délétères au niveau cardiaque en stimulant la prolifération des fibroblastes et l'hypertrophie de même que l'apoptose des cardiomyocytes via des voies de signalisation de croissance telles que décrites précédemment.^{44,220,221}

Aussi, des évidences démontrent que l'action de AngII sur son récepteur peut entraîner la phosphorylation des résidus tyrosine intracellulaires et ainsi transactivant le récepteur du facteur de croissance épidermique EGF.²²² En fait, l'inhibition de récepteur à l'EGF bloque l'activation de ERK, l'expression de c-fos, la synthèse protéique et la prolifération cellulaire induite par l'AngII.^{222,223} Outre la transactivation du récepteur à l'EGF, l'AngII induit la transactivation du récepteur PDGF- β ²²⁴ cependant les conséquences de cette transactivation ne sont pas connues. D'ailleurs, les conséquences *in vivo* de la transactivation des récepteurs des facteurs de croissance par l'AngII demeurent mal caractérisées.

Dans les CML et les fibroblastes, les effets du récepteur AT₁ sur la croissance cellulaire sont antagonisés par les récepteurs AT₂ notamment à travers l'activité de phosphatases interférant avec la voie ERK.²²⁵ Parmi ces phosphatases associées aux récepteurs AT₂, on retrouve MKP-2,^{226,227} SPP2A²²⁸ et SHP-1.²²⁹ Par ailleurs, dans les CML vasculaires transfectées avec le récepteur AT₂, il a été démontré que l'AngII via ce récepteur est associé à une diminution de l'expression de c-fos.²³⁰ Chez le SHR, la surstimulation des récepteurs AT₂ suite à un traitement anti-hypertenseur avec le losartan inhibe la synthèse d'ADN *in*

vivo. Ce phénomène est renversé lors de la co-administration d'un antagoniste AT_2 ,²³¹ suggérant un rôle anti-prolifératif pour les récepteurs AT_2 . Cependant, ce rôle des récepteurs AT_2 *in vivo* dans le remodelage est controversé car certains groupes,^{232,233} mais pas d'autres,^{234,235} ont démontré qu'un antagoniste AT_2 atténue la masse aortique dans différents modèles expérimentaux d'hypertension et donc possèdent des effets pro-croissantes.

1.3.4.2. Effets sur la mort cellulaire

Tel que décrit ci-haut, l'AngII induit la prolifération cellulaire via les récepteurs AT_1 . Parallèlement, dans des cultures de CML vasculaires, l'administration d'AngII agit via un mécanisme impliquant les récepteurs AT_1 pour bloquer la mort cellulaire programmée induite par les donneurs de NO. Dans des CML transfectées avec le récepteur AT_2 , la stimulation des récepteurs AT_1 active la voie ERK et inhibe l'apoptose induite par la déprivation en sérum tandis que la stimulation du récepteur AT_2 inhibe l'activation d'ERK et potentialise l'apoptose. Ces données suggèrent que le récepteur AT_2 induit l'apoptose alors que le récepteur AT_1 l'inhibe. D'autre part, d'autres études ont démontré que l'infusion d'AngII induit l'apoptose des CML par l'activation des deux sous types de récepteurs à l'AngII. Dans le cas de l'apoptose médiée par AT_1 , celle-ci serait secondaire à une poussée de croissance vasculaire.²³⁶ De plus, l'apoptose induite par la stimulation sélective des récepteurs AT_2 dans des cellules endothéliales humaines en culture est associée à l'activation des caspases (enzymes impliquées dans la mort cellulaire) et les donneurs du NO inhibent l'apoptose dans ces cellules.²³⁷ Cependant, le NO induit l'apoptose des CML vasculaires via l'augmentation du ligand Fas,²³⁸ cependant l'implication du GMPc dans ce processus est controversée.^{239,240} D'autre part, des études sur les CML humaines en culture montrent que l'apoptose induite par les cytokines passe par des voies dépendantes et indépendantes du NO.²⁴¹ *In vivo*, la stimulation des récepteurs AT_2 et l'inhibition de l'ECA ont été associées à une augmentation de la

production de BK, NO et GMPc.^{242,243} Dans l'ensemble, ces études *in vitro* démontrent le rôle pro-apoptotique du récepteur AT₂ et selon une perspective physiologique, il a été suggéré que le récepteur AT₂ agit comme antagoniste du récepteur AT₁ dans les processus de croissance/survie cellulaire.

Nos études chez le SHR ont démontré que l'apoptose des CML aortiques induite par les antagonistes AT₁ était abolie lors de la co-administration d'un antagoniste AT₂ (PD123319); ce qui suggère que les récepteurs AT₂ jouent un rôle pro-apoptotique dans ce type cellulaire *in vivo* (voir annexe²³¹). De plus, une augmentation de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax a été observé dans des vaisseaux coronaires de SHR traités avec un iECA comparativement aux animaux non-traités.²⁴⁴ Des travaux de notre laboratoire ont démontré que l'apoptose cardiaque est augmenté par les bloqueurs AT₁ et les iECA dans le coeur du SHR. Dans le même modèle, ces mêmes médicaments préviennent l'apoptose des cardiomyocytes à long terme.²⁴⁵⁻²⁴⁸ D'ailleurs, des études ont démontré des niveaux d'expression de Bax beaucoup plus élevés dans les cardiomyocytes de SHR que de WKY²⁴⁹ et que cette surexpression de la protéine Bax et l'apoptose des cardiomyocytes étaient atténuées par les antagonistes AT₁.²⁴⁹ Ceci démontre le rôle de l'AngII dans le contrôle de l'expression des protéines régulant le processus apoptotique ainsi que l'effet cardioprotecteur des antagonistes de la voie de l'angiotensine.

Dans les cultures de cardiomyocytes néonataux, l'induction de l'apoptose via le récepteur AT₂ implique l'inhibition de la voie ERK par au moins deux mécanismes, soit l'activation des phosphatases MKP-1 ou SHP-1. Par contre, d'autres études ont rapporté que l'AngII induit l'apoptose dans les cardiomyocytes en culture via une voie impliquant la PLC associée à l'activation du récepteur AT₁; un effet bloqué par le losartan.²²⁰ L'origine de ces divergences au niveau du rôle des récepteurs AT₁ et AT₂ dans l'apoptose des

cardiomyocytes demeure incertaine. Les caractéristiques des cellules et les conditions expérimentales sont probablement responsables. De plus, le type de kinase activée détermine soit la réponse hypertrophique ou apoptotique des cardiomyocytes compte tenu du rôle central qu'occupent ces molécules dans le relai de signaux de survie cellulaire *in vitro* et *in vivo*.²⁵⁰⁻²⁵²

1.3.4.3. Régulation de la survie selon le type cellulaire

Dans l'ensemble, les données énumérées ci-haut démontrent que les effets de l'AngII sur la croissance ou l'apoptose cellulaire semblent dépendre du type cellulaire et du sous-type de récepteur à l'AngII. Les Tableaux II et III résument les conséquences structurales cardiovasculaires d'une telle modulation différentielle entre la croissance et l'apoptose. au cours de la pathologie et de la thérapie.²⁵³

Tableau II: Rôle du récepteur AT₁ selon les types cellulaires sur la croissance et l'apoptose du système cardiovasculaire et les conséquences structurales.

Types cellulaires	Croissance	Apoptose	Conséquences structurales
<i>Cœur</i>			
Cardiomyocytes	↑	↑	Hypertrophie cardiaque, perte de cardiomyocytes ^{254,255}
Fibroblastes	↑	↓	Hyperplasie, fibrose ^{256,257}
<i>Vaisseaux</i>			
CML	↑	↓	Hypertrophie, hyperplasie ^{225,231}
Endothéliales	↑	↑	Dommage endothélial ^{237,258}

Le rôle des récepteurs AT₂ dans les effets bénéfiques associés aux antagonistes AT₁ sont décrit dans le Tableau III.

Tableau III : Rôle du récepteur AT₂ selon les types cellulaires sur la croissance et l'apoptose du système cardiovasculaire et les conséquences structurales.

Types cellulaires	Croissance	Apoptose	Conséquences structurales
<i>Coeur</i>			
Cardiomyocytes	↓↑	↑	Modulation de l'hypertrophie cardiaque, délétion de cardiomyocytes ²⁵⁵ Inhibition de l'hyperplasie et de la fibrose ²⁵⁹
Fibroblastes	↓	↑	
<i>Vaisseaux</i>			
CML	↓	↑	Inhibition de l'hypertrophie et de l'hyperplasie ^{225,231} Diminution du renouvellement cellulaire ^{237,260}
Endothéliales	↓	↑	

En relation avec le Tableau III, le rôle du récepteur AT₂ sur la croissance/survie des cardiomyocytes semble être moins clair. Dans ces cellules, les récepteurs AT₂ inhibent la synthèse protéique induite par l'endothéline *in vitro* et médient l'apoptose des cardiomyocytes isolés des SHR, mais non pas des WKY.²⁵⁵ D'autre part, des études récentes ont démontré que la souris « knock-out » pour le récepteur AT₂ ne développe pas l'hypertrophie cardiaque suite à la coarctation aortique ou l'infusion de l'AngII.^{261,262} Ainsi, ces divergences dans le rôle du récepteur AT₂ sur la croissance/survie des cardiomyocytes semblent être dépendants du contexte.²⁵⁹ De plus, ces divergences de la fonction du récepteur AT₂ dans le contrôle de la croissance existent aussi pour d'autres types cellulaires. Certaines études démontrent que le récepteur AT₂ inhibe la croissance cellulaire et induit l'apoptose dans des CML en culture,²⁶³ tandis que d'autres études suggèrent que ce récepteur pourrait être impliqué dans la croissance de ces mêmes cellules chez des animaux traités chroniquement avec des antagonistes AT₂.^{232,233,264}

Considérant que les niveaux d'expression des récepteurs AT₁ et AT₂ peuvent être altérés dans la pathologie et la thérapie, il est possible de supposer que le ratio d'expression de ces deux récepteurs joue un rôle dans la détermination de la réponse cellulaire à l'AngII.

1.3.4.4. Effets sur la matrice extracellulaire

Dans les CML vasculaires en culture, l'AngII augmente la synthèse de collagène de type I, III et V,²⁶⁵ fibronectine,^{265,266} thrombospondine,²⁶⁷ laminine, ostéopontine et de tenascine.^{268,269} La surstimulation de la synthèse du collagène par l'AngII chez les patients hypertendus en plus de la diminution de l'activité des MMP²⁷⁰⁻²⁷² contribue potentiellement au développement de la fibrose cardiaque. Par ailleurs, les iECA et les antagonistes AT₁ diminuent l'expression des sous types de collagène, de fibronectine et de la laminine, alors qu'ils renversent l'atténuation de l'activité de la MMP-1²⁷³⁻²⁷⁶ ce qui contribue à la suppression et régression de l'hypertrophie cardiovasculaire.

Les intégrines sont une famille de récepteurs d'adhésion des molécules de la matrice extracellulaire impliquées dans la prolifération, migration et différenciation cellulaire dans les conditions physiologiques et pathologiques. *In vitro*, la stimulation des récepteurs AT₁ augmente l'adhésion des CML vasculaires aux protéines de la matrice tel que la fibronectine et le collagène. Aussi, il a été démontré que les iECA et les antagonistes AT₁ inhibent l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1, la protéine chimiotactique MCP-1, et la E-sélectine,²⁷⁷⁻²⁸¹ démontrant l'implication de l'AngII dans la réponse migratoire et proliférative.

1.3.4.5. Effets sur la contractilité vasculaire

L'AngII via le récepteur AT₁ entraîne une augmentation du calcium intracellulaire à travers les effecteurs dont la PLC, l'IP₃, DAG et PKC produisant une

vasoconstriction. Des études *ex vivo* dans des bains d'organes isolés à partir de carotides de rat dénudées d'endothélium ont démontré que l'AngI et/ou l'AngII induisent des contractions croissantes en fonction de la dose administrée et semblent avoir des affinités apparentes similaires.^{188,282} Ceci suggère que l'ECA tissulaire n'est pas une étape limitante dans la génération d'AngII dans la média. Les niveaux d'expression de l'ECA varient d'un vaisseau et d'une espèce à l'autre. Dans les vaisseaux endommagés, il y a une surexpression de l'ECA et des récepteurs AT₁ ce qui permet de potentialiser les effets vasoconstricteurs de l'AngII. Par ailleurs, cette potentialisation de la réponse vasoconstrictrice est possiblement modulée par la vasodilatation associée aux récepteurs AT₂ qui sont aussi surexprimés dans ces vaisseaux endommagés.²⁸³ Cette réponse vasodilatatrice associée aux récepteurs AT₂ est plus évidente lorsque les récepteurs AT₁ sont bloqués.

1.3.4.6. Effets sur l'endothélium

L'endothélium est une monocouche cellulaire sur le muscle lisse qui joue un rôle de tampon entre le sang et la paroi vasculaire. Elle est impliquée dans la modulation du tonus vasculaire et assure les réponses de vasorelaxation par sa production du médiateur clé de endothélium le NO réalisé à travers l'activité de sa synthétase eNOS constitutive.

Les deux sous-types de récepteurs de l'AngII sont présents au niveau de l'endothélium, par contre le récepteur AT₁ est prédominant.²⁶⁰ L'activation du récepteur AT₁ par l'AngII induit la libération du calcium intracellulaire ce qui active la eNOS et entraîne la génération de NO. Alternativement, l'activation du récepteur AT₂ induit l'activation de la kininogénase et la production de BK qui elle active la eNOS et entraîne la production de NO via les récepteurs endothéliaux. Par conséquent, l'AngII peut avoir des effets contractiles directs sur

le muscle lisse, mais en présence d'endothélium sain ou fonctionnel elle entraîne une vasodilatation.²⁸⁴

1.3.4.6.1. Métabolisme de l'oxygène

Le métabolisme de l'oxygène par les cellules génère des médiateurs intracellulaires, dont le NO ainsi que des ROS, assurant la transmission de divers signaux. Plusieurs ROS délétères possèdent des électrons non-pairés et sont des radicaux libres d'oxygène e.g. l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyl (HO^\cdot) et les lipides oxydés. Les autres ROS tel le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le peroxynitrite ($ONOO^-$) et l'acide hypochloreux ($HOCl$) ne sont pas des radicaux libres en soi, cependant elles contribuent à l'oxydation.²⁸⁵ Les trois mécanismes antioxydants endogènes sont le superoxyde dismutase (SOD), qui convertit le O_2^- en H_2O_2 , la catalase, qui réduit H_2O_2 en eau, et le glutathion réduit (GSH) qui représente une voie alternative pour la réduction du H_2O_2 . De plus, il existe des voies alternatives générant le O_2^- tel le système NADH/NADPH oxydase sous l'influence de l'AngII et la xanthine oxydase (XO).

Sous les conditions physiologiques basales, la formation ainsi que l'élimination de médiateurs pro-oxydants sont en équilibre. Cependant, un déséquilibre au niveau des médiateurs pro-oxydants générés et les réserves antioxydants de la cellule engendre une condition pathologique nommé *stress oxydatif*.¹⁶

1.3.4.6.2. Stress oxydatif

L'AngII active le système NADH/NADPH oxydase et induit la production de radicaux libres. Dans les CML en culture, l'AngII stimule via ce système la production de H_2O_2 , la synthèse d'ADN et protéique ainsi que la phosphorylation des MAP kinases rédox-sensibles tels ERK5, JNK et p38.²⁸⁶⁻²⁸⁸ D'autres études faites sur des CML vasculaires provenant de patients hypertendus ont démontrées que l'AngII augmente le stress oxydatif par une voie PLD-dépendante et

impliquant le système NADH/NADPH oxydase.^{287,289} L'infusion d'AngII *in vivo* chez le rat double la production de O_2^- dans l'aorte via l'activation du système NADH/NADPH oxydase par un mécanisme dépendant des récepteurs AT₁ mais pression indépendante.¹⁴⁷ De plus, il a été démontré que le pré-traitement au losartan chez des rats infusés à l'AngII diminue l'activation du système NADH/NADPH oxydase et réduit subséquemment le taux de production de O_2^- .²⁹⁰ Pris dans leur ensemble, ces évidences suggèrent que l'AngII, par l'intermédiaire de son récepteur AT₁ induit la production de ROS *in vitro* et *in vivo* puis stimule l'hypertrophie cellulaire en partie par l'activation de la voie PLD et des kinases dans les CML. L'activité augmentée de la NADPH oxydase dans l'hypertension induite par l'AngII est due à une régulation à la hausse de la NADPH oxydase par une augmentation de la transcription de l'ARN du p22^{phox}; une composante cruciale de l'oxydase.²⁹¹ Récemment l'implication de c-Src a été démontré dans cette régulation à la hausse du contenu protéique de la p22^{phox}.²⁹² Le rôle central occupé par la NADPH oxydase dans la dysfonction endothéliale et l'hypertrophie vasculaire dans l'hypertension est bien établi. De plus l'existence de polymorphismes du gène de la p22^{phox} ont été suggéré. Ce nouveau marqueur potentiel du stress oxydatif pourrait expliquer la régulation anormale de l'oxydase dans la pathologie.

1.3.4.6.3. Survie cellulaire

Il a été suggéré que le NO produit par la réaction catalytique de la eNOS sur la L-arginine limite la croissance vasculaire des CML, ce qui suppose qu'une diminution de la biodisponibilité du NO, une caractéristique de la dysfonction endothéliale, pourrait favoriser l'hypertrophie vasculaire. La régulation de la balance entre la croissance et la mort selon les types cellulaires en réponse à un même stimulus n'est pas limitée à l'AngII, tel que nous avons décrits ci-haut à la section 1.3.4.3.. En fait, des études *in vitro* ont démontré que les ROS tel le O_2^- induit l'apoptose des cardiomyocytes via une voie p53 dépendante,^{293,294} et que

d'autre part, le O_2^- augmente la croissance/survie des CML et des fibroblastes^{287,294-298}, un effet qui d'ailleurs peut être induit par l'AngII.²⁹⁹ En fait, il existe une relation entre le niveaux de glutathione et la prolifération des CML.³⁰⁰ Par ailleurs, le NO stimule l'effet opposé en induisant l'apoptose dans les CML et les fibroblastes via des voies GMPc dépendantes et indépendantes.³⁰¹⁻³⁰⁴ De même, O_2^- induit l'apoptose des cardiomyocytes via une voie p53 dépendante.^{293,294} Aussi, plusieurs stimuli incluant l'étirement mécanique, les cytokines et la stimulation α -adrénergique peuvent induire l'apoptose via un mécanisme ROS-dépendant. Dans l'ensemble, ces études suggèrent que la balance entre les ROS et le NO est un déterminant majeur du contrôle de la survie/prolifération cellulaire du système cardiovasculaire. Compte tenu de cette prémisses, l'état de l'endothélium (normal ou dysfonctionnel) serait le « réostat » du contrôle de la survie cellulaire.

La Figure 3 schématise ceci en démontrant que dans un endothélium sain, le NO stimule l'apoptose en plus de diminuer la croissance des CML. D'autre part, un endothélium dysfonctionnel, pouvant être causé entre-autre par une déficience du cofacteur essentiel de la eNOS le BH_4 (voir section 1.1.5.2.3.) serait une condition qui privilégierait le H_2O_2 et son effet pro-apoptotique et pro-croissance sur les cardiomyocytes et les CML respectivement. De ce fait, le stress oxydatif vasculaire due au débalancement de la fonction endothéliale contribue à la pathophysiologie des maladies cardiovasculaires. La perte de la balance entre la croissance et la mort cellulaire se retrouve à la base des complications associées à la morbidité cardiovasculaire dans l'hypertension.

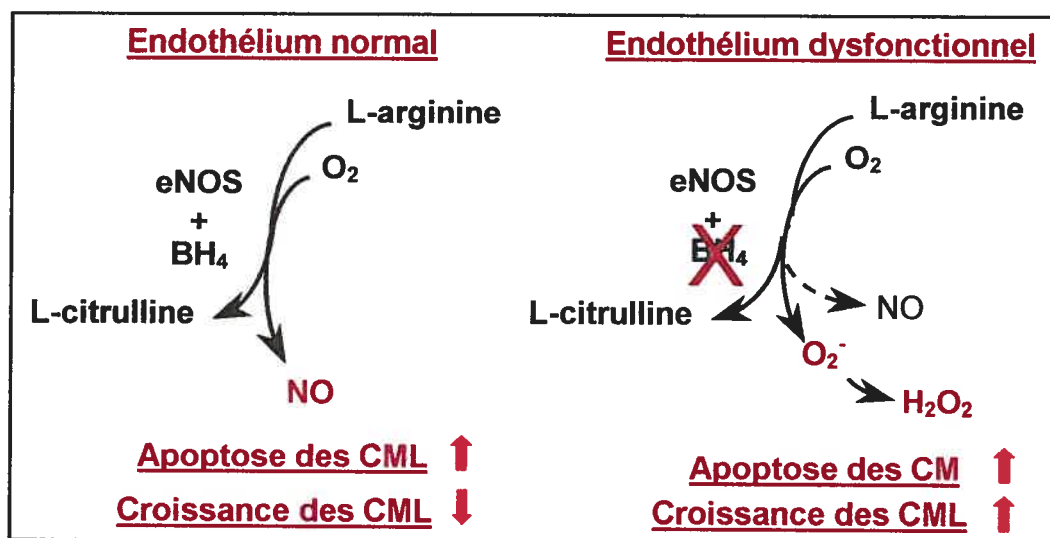


Figure 4 : Balance croissance/apoptose cellulaire dans endothélium normal et dysfonctionnel.

1.3.4.6.4. Tonus vasculaire

Les ROS modulent la fonction endothéliale, le tonus et la structure du système vasculaire. Les ROS causent une vasoconstriction aortique isolée via l'activation de la voie ERK.³⁰⁵ D'autre part, H_2O_2 induit une relaxation dans des coronaires *ex vivo* précontractées. En fait, H_2O_2 peut médier des relaxations vasculaires dépendantes de l'endothélium, cependant une exposition continue de H_2O_2 endommage la couche de cellules endothéliale.³⁰⁶ Par ailleurs, l'anion O_2^- induit la contraction des CML³⁰⁷ cause une perte d'intégrité de l'endothélium³⁰⁸ et réagit avec le NO (médiateur vasorelaxant par excellence) pour former le ONOO- qui entraîne une diminution du NO et de ce fait la capacité de relaxation artérielle.³⁰⁹

1.3.4.6.5. Effets pathophysiologiques

Les ROS régulent l'activité des MMP et le remodelage de la matrice extracellulaire. Ainsi, le stress oxydatif peut induire des changements cellulaires

associés au remodelage ventriculaire et donc représente un signal important dans le développement de la défaillance cardiaque. Aussi, le ONOO⁻ formé à partir de l'action oxydante du O₂⁻ sur le NO est responsable du dommage vasculaire³¹⁰ en causant l'oxydation des protéines, de l'ADN et des lipides des CML.³¹¹

Les ROS sont pro-inflammatoires et stimulent la migration des monocytes et oxydent les LDL compromettant la fonction endothéliale vasculaire.³¹² De plus, l'AngII se co-localise avec les macrophages, augmente leur capacité à accumuler ces LDL oxydés³¹³ et induit les cytokines et chémokines impliquées dans l'inflammation, favorisant la maladie athérosclérotique et la formation d'anévrismes.³¹⁴ Dans différents modèles *in vivo*, les iECA et antagonistes AT₁ atténuent le développement de l'athérosclérose en diminuant le contenu aortique en cholestérol et l'oxydation des lipides en diminuant le stress oxydatif.

1.3.5. Applications cliniques du blocage du SRA

Depuis la fin des années 70, le SRA est devenu un système effecteur très étudié dans la pathologie cardiovasculaire du fait qu'il s'est avéré une cible thérapeutique extrêmement intéressante. Au cours des dernières années l'utilisation des agents inhibiteurs de la voie de l'AngII particulièrement les iECA et les antagonistes AT₁ a pris beaucoup d'ampleur dans le traitement de l'hypertension artérielle. La popularité de ces agents est principalement attribuable à leurs effets protecteurs cardiovasculaires en plus de leur efficacité à diminuer la pression artérielle.

Le principal mécanisme d'action antihypertenseur des iECA est la réduction des niveaux d'AngII circulants ce qui mène à une diminution de l'action physiologique de ce peptide. En plus de catalyser la formation de l'AngII, l'ECA (ou kininase II) catalyse la dégradation de la BK.³¹⁵ La BK favorise la vasodilatation en stimulant la production de métabolites d'acides arachidoniques,

de NO et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium vasculaire³⁴ à travers l'activation des récepteurs B2 de l'endothélium vasculaire.³¹⁶ Vu que l'ECA est identique à la kininase II, les iECA peuvent théoriquement potentialiser l'effet direct des kinines endogènes. De plus, la BK produit la natriurèse via des effets directs sur le rein.³¹⁷ Un autre mécanisme bénéfique à plus long terme des iECA serait l'inhibition des actions trophiques de l'AngII. De même, les iECA diminuent le stress oxydatif en atténuant l'activité de la NADPH oxydase et aussi en diminuant le stress causé par la haute pression sur l'endothélium ce qui augmente la production de ROS et les effets trophiques attribués à ceux-ci. Ainsi, les iECA peuvent prévenir ou induire une régression structurale ventriculaire ou vasculaire contribuant au maintien de la réduction de la pression artérielle en plus de réguler l'équilibre entre les propriétés vasodilatatrices et natriurétiques, et les propriétés de rétention sodique de l'AngII.

Les antagonistes AT₁ inhibent les effets contractiles de l'AngII sur les préparations de CML vasculaires *in vitro*, et *in vivo* elles préviennent ou renversent tous les effets pressives et trophiques connus de l'AngII. L'utilisation des antagonistes des récepteurs AT₁ est associée à une augmentation du niveau d'AngII circulante ce qui entraîne la stimulation sélective des récepteurs AT₂ qui semble être responsable des effets protecteurs au niveau vasculaire entre-autre via l'inhibition de la croissance et la stimulation de l'apoptose des CML vasculaire (voir annexe²³¹).

1.4. APOPTOSE: DÉFINITION ET IMPLICATIONS THÉRAPEUTIQUES

Dans le cœur et les vaisseaux normaux, comme dans tous les tissus, il y a une homéostasie cellulaire, c'est-à-dire un équilibre entre la prolifération et la mort. La mort cellulaire par apoptose peut être modulée par divers facteurs endogènes et

exogènes dont certains agents thérapeutiques. Un déséquilibre dans l'homéostasie cellulaire d'un tissu peut entraîner des conséquences physiologiques importantes qui sont sous-jacentes au développement de diverses pathologies dont le remodelage cardiovasculaire précédemment abordé. Dans le but d'élaborer de meilleures stratégies thérapeutiques, il est essentiel de comprendre les mécanismes pathophysiologiques cellulaires impliqués dans le dommage aux organes cibles de l'hypertension.

1.4.1. Définition, critères morphologies, biochimiques et biocascade

1.4.1.1. Description

L'homéostasie de tous les organismes multicellulaires dépend à la fois de la capacité des organismes à produire de nouvelles cellules, mais aussi de la capacité des cellules à mourir lorsqu'elles sont superflues ou dysfonctionnelles.³¹⁸⁻³²⁰ Cette capacité des cellules à mourir ou s'autodétruire lorsque nécessaire est communément appelée *la mort cellulaire programmée*. Par opposition à tout autre type de mort, la mort cellulaire programmée est un processus actif mettant en action le métabolisme propre de la cellule. La programmation de la mort suppose l'existence de gènes spéciaux, les thanatogènes,³²¹ qui contrôlent l'expression des protéines responsables de la mort aux moments précis. Il existe actuellement dans la littérature, diverses formes de mort cellulaire programmées ainsi que divers termes pour les décrire. Par contre, il a été suggéré que le terme *apoptose* soit défini comme la mort cellulaire programmée dépendante de l'activation des caspases.³²²

En conditions normales dans des tissus non-pathologiques humains ou animaux, l'apoptose est présente à de faibles niveaux et agit en contrepartie essentielle à la prolifération cellulaire afin de maintenir l'*homéostasie* du tissu.³¹⁸ Par exemple, l'apoptose a été documentée au cours du développement embryonnaire, lors du

remodelage physiologique post-natal,³²³ dans la maturation néonatale normale du ventricule droit,³²⁴ durant le vieillissement ³²⁵ etc. Au cours de la dernière décennie, la recherche en santé dans plusieurs domaines a permis d'établir une association entre diverses pathologies humaines et des dérèglements du processus apoptotique. Une augmentation de l'apoptose est associée à une *raréfaction* (tissulaire et/ou cellulaire) caractéristique de certaines maladies neurodégénératives tels l'Alzheimer, le Parkinson et la sclérose latérale amyotrophique, dans des désordres immunitaires, dans la pathogénie associée avec la morbidité cardiaque e.g. la perte de neurones contribuant aux problèmes de conduction,³²⁴ la perte de cardiomyocytes contribuant à la défaillance cardiaque³²⁶⁻³²⁸ ainsi que dans des épisodes d'ischémie-reperfusion, d'infarctus de myocarde, d'AVC,³²⁰ etc. Par ailleurs, une diminution ou une inhibition des taux d'apoptose est associée à l'*hyperplasie* cellulaire présente dans certaines maladies auto-immunes, divers types de néoplasies^{329,330}, dans l'adaptation à l'augmentation de la surcharge pressive,³³¹ dans l'hypertension,⁹² etc.

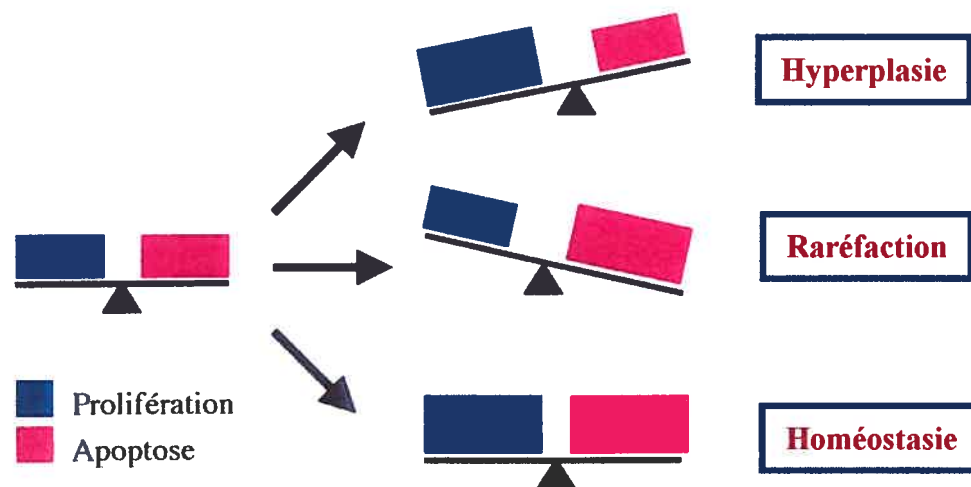


Figure 5 : Modulation de l'équilibre prolifération/ apoptose cellulaires et les répercussions au niveau de la structure tissulaire.

Le processus apoptotique peut être initié par un régulateur interne à la cellule, ou par des agents extracellulaires dont les cytokines, les hormones, divers agents chimiques etc. L'apoptose est un phénomène extrêmement rapide compte tenu que la cellule démontre des aspects macroscopiques caractéristiques à ce processus seulement quelques minutes suite à l'induction du stimulus de mort.^{332,333} et que les corps apoptotiques marquant la culmination du processus demeurent dans le tissu pendant quelques heures si elles ne sont pas phagocytées immédiatement (voir section 1.4.1.2.).

La connaissance des voies de signalisation et des molécules impliquées dans les processus apoptotiques de ces diverses pathologies entraîne l'élaboration ou l'amélioration de stratégies thérapeutiques.

1.4.1.2. Critères morphologiques

Dans un tissu normal, l'apoptose atteint habituellement quelques cellules isolées.³³⁴ La description initiale de l'apoptose a été basée sur des critères morphologiques observés en microscopie principalement sur des cellules en culture.³³⁵ Généralement, lorsqu'un ou des signaux de mort par apoptose sont reçus, la cellule subit une série de changements morphologiques qui peuvent être divisés en trois étapes, ³³³

La première étape est caractérisée par une altération nucléaire et cytoplasmique. La chromatine des cellules apoptotiques se condense pour former un croissant homogène plus ou moins volumineux. Dans le cytoplasme, les organelles particulièrement les mitochondries, les filaments du cytosquelette et les ribosomes libres, se rapprochent et s'agglomèrent. Par contre, à ce stade, le réticulum endoplasmique et les mitochondries restent intacts,³³⁶ contrairement à la nécrose où il y a des évidences de profondes altérations morpho-fonctionnelles (gonflement) des organelles.(Figure 5³³⁵)

La seconde étape est marquée par l'apparition d'un créneau dans la membrane nucléaire caractéristique de la fragmentation nucléaire et cytoplasmique qui entraîne la formation de fragments cellulaires reliés les uns aux autres par des ponts cytoplasmiques.^{333,337} À cette étape, le volume cellulaire est considérablement diminué alors que la densité est augmentée. La membrane plasmique est déformée donnant l'apparence de bourgeonnement (phénomène de « blebbing »).^{333,337} Les fragments cellulaires appelés corps apoptotiques se détachent les uns des autres et sont phagocytés par des macrophages ou des cellules voisines.³³⁴

La troisième étape est caractérisée par la dégradation des corps apoptotiques. Cette dégradation entraîne des lésions de la membrane plasmique ayant pour conséquence une destruction des reliquats cytoplasmiques et nucléaires par les cellules phagocytaires.^{333,337} La disparition des corps apoptotiques n'est accompagnée d'aucune réaction inflammatoire lymphocytaire, phénomène de fibrose ce qui distingue encore une fois l'apoptose de la nécrose.^{333,334,337}

1.4.1.3. Critères biochimiques

L'apoptose dans des tissus ou dans des cultures cellulaires peut être évaluée par des critères morphologiques tels que mentionné ci-haut, par contre l'évaluation de certains critères biochimiques sont essentiels à l'identification de l'apoptose, dont les mieux caractérisés sont décrits ci-dessous.

L'expression des phosphatidylsérines à la surface de la membrane plasmique des cellules apoptotiques permettrait aux cellules voisines et aux macrophages de reconnaître et de phagocyter les corps apoptotiques. Les phosphatidylsérines sont des phospholipides membranaires normalement exprimées à la surface interne de la membrane cytoplasmique. Par contre, lors du remaniement de la membrane

cytoplasmique associé aux changements morphologiques dans les cellules apoptotiques, il y a extériorisation des phosphatidylsérines.³³⁸

Les transglutaminases sont des enzymes cytoplasmiques dépendantes du calcium et responsables des modifications ultra structurales du cytoplasme lors du processus apoptotique (agglomération des organelles et augmentation de la densité cellulaire) et de la formation des corps apoptotiques.^{330,339}

L'activation des caspases est un critère biochimique dans la définition actuelle du terme apoptose. Les caspases sont une famille de protéases à cystéine, qui clivent leur substrats au niveau d'un résidu aspartate. Ces enzymes dont quatorze homologues humains ont été identifiés jusqu'à présent sont exprimées de façon constitutive sous forme de zymogènes dans tous les types cellulaires des organismes multicellulaires. Les caspases sont responsables d'une protéolyse cellulaire hautement spécifique³⁴⁰ (voir section 1.4.1.6.).

La fragmentation internucléosomale de l'ADN est une fragmentation spécifique par une endonucléase en gros fragments (20-50 kpb) suivi par une fragmentation en petits fragments, soit des segments de 180 paires de bases nucléiques ou en leurs multiples.³⁴¹ Sur le plan biochimique, la fragmentation internucléosomale de l'ADN correspond au remaniement de l'ADN observé au cours de la condensation de la chromatine. En 1980, Wyllie a été le premier à rapporter que la migration sur gel d'agarose de l'ADN extrait de thymocytes apoptotiques avait un aspect en échelle d'où le terme « DNA laddering »³³⁷ (voir section 1.4.1.8.).

1.4.1.4. Apoptose versus nécrose

La mort cellulaire accidentelle à laquelle le terme nécrose fait référence est très différente de la mort cellulaire programmée par apoptose. Par opposition à l'apoptose, la nécrose est considérée comme une mort cellulaire non-

physiologique. La nécrose est caractérisée par des changements irréversibles au niveau du noyau et du cytoplasme : condensation, perte de structure et fragmentation aléatoire. Elle est définie selon une série de critères spécifiques dont le gonflement des organelles (particulièrement de la mitochondrie) ainsi qu'une augmentation de la perméabilité membranaire. Ceci à pour conséquence le déversement du contenu cellulaire dans le milieu extracellulaire entraînant une réaction inflammatoire. Ce type de mort cellulaire est généralement engendré lors d'ischémie ou par des agents toxiques qui interfèrent avec la perméabilité membranaire. La Figure 5 ci-dessous schématise les différences morphologiques entre l'apoptose et la nécrose, tandis que le Tableau IV résume les principales caractéristiques de l'apoptose et de la nécrose.^{326,335}

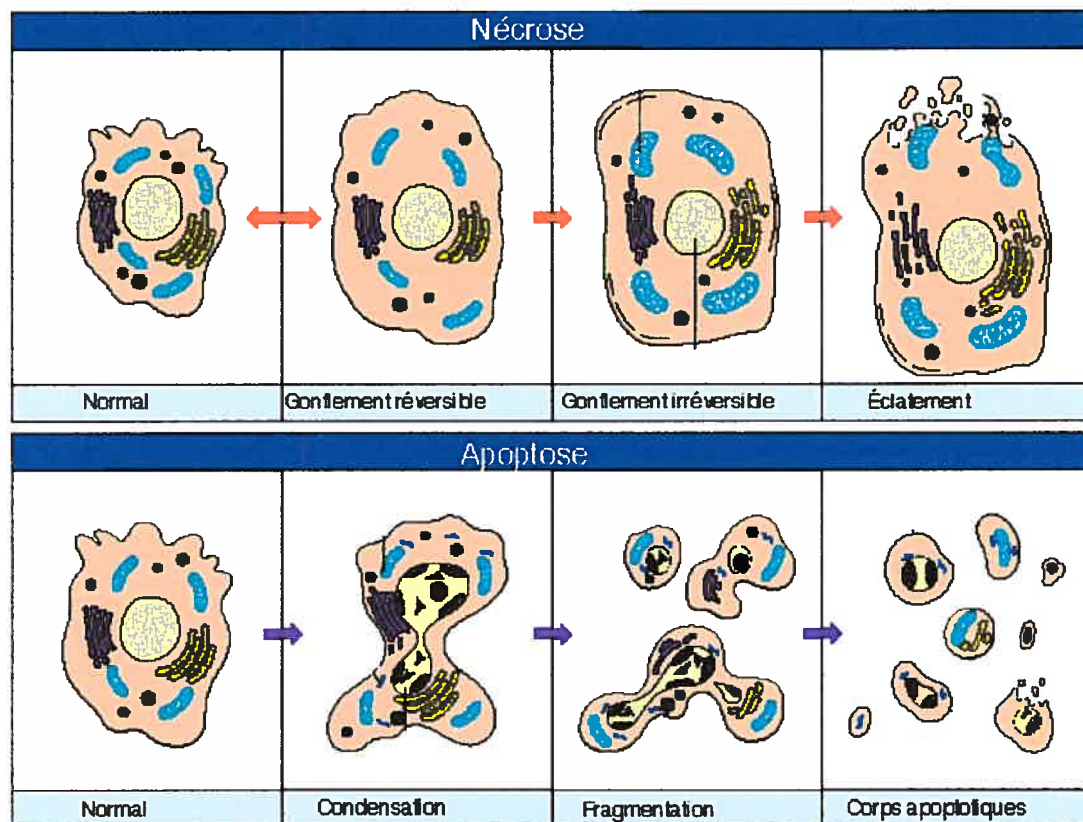


Figure 6 : Schématisation des différences morphologiques : apoptose vs nécrose.

Tableau IV : Comparaison entre la mort cellulaire par apoptose et par nécrose

Apoptose	Nécrose
Condensation de la cellule	Gonflement de la cellule
Peu de gonflement de la mitochondrie	Gonflement de la mitochondrie
Intégrité membranaire intacte initialement	Perte de l'intégrité membranaire
Dégradation de l'ADN en oligonucléosomes	Dégradation aléatoire de l'ADN
Absence ou peu d'inflammation	Réponse inflammatoire importante

1.4.1.5. Biocascades cellulaires de l'apoptose : la phase d'initiation

Le processus apoptotique peut être subdivisé en quatre phases : l'initiation, le contrôle, l'exécution et la dégradation. L'ensemble de la cascade apoptotique ainsi que les différentes molécules impliquées dont les molécules pro et anti-apoptotiques sont résumées à la Figure 6^{257,342-345} et dans le Tableau V.

La phase d'initiation est induite par un ou plusieurs signaux reçus par la cellule. Parmi les mécanismes initiateurs ou déclencheurs du processus apoptotique, on retrouve le stress (oxydatif, mécanique, thermique, etc.), les erreurs dans la séquence d'ADN, la déprivation en facteurs de croissance, les glucocorticoïdes, les radiations ionisées, les dommages tissulaires etc. Les deux voies majeures de signalisation sont la *voie associée aux récepteurs de mort* et la *voie mitochondriale*.

1.4.1.5.1. Voie associée aux récepteurs de mort

La voie de signalisation du ligand Fas est utilisée comme modèle pour illustrer la signalisation associée aux récepteurs de mort. Fas est un membre de la famille des récepteurs de mort dans laquelle on retrouve également les récepteurs de la cytokine TNF (« Tumor necrosis factor »). Tous ces récepteurs partagent un même motif de signalisation cytoplasmique appelé le domaine de mort (« death domain »).³⁴² Les récepteurs de mort ne contiennent pas de motifs à activité

kinase ou phosphatase intrinsèque, ce qui suggère que leur voie de signalisation implique le recrutement de protéines intracellulaires³²⁶ dont les protéines contrôlant la libération ou la génération de céramides (lipides complexes de la membrane plasmique) ainsi que des complexes impliquant les caspases à long pro-domaine et dont la formation est responsable de la phase d'exécution de l'apoptose.³⁴⁶ Il a été rapporté que la stimulation du récepteur AT₂ de l'AngII est associée à une synthèse *de novo* de céramides^{347,348} et que les récepteurs AT₂ de l'AngII induisent l'apoptose dans les CML vasculaires *in vivo*.²³¹ La signalisation de la voie Fas implique l'assemblage d'un complexe comprenant les pro-caspases 8 et 10, agissant comme agents initiateurs de la cascade apoptotique.

1.4.1.5.2. Voie mitochondriale

Auparavant considéré comme un amplificateur du processus apoptotique,³⁴⁹⁻³⁵¹ on attribue maintenant à la mitochondrie un rôle initiateur dans l'apoptose dans certains cas.^{352,353} Contrairement aux signaux apoptotiques empruntant la voie des récepteurs de mort et nécessitant la formation de complexes au niveau du récepteur membranaire, les signaux tel que les dommages à l'ADN causés par les agents chimiothérapeutiques ou les radiations ionisantes induisent la formation de complexes cytoplasmiques dépendant du cytochrome c. Le cytochrome c que l'on retrouve habituellement au niveau de l'espace intermembranaire de la mitochondrie est relâché dans le cytoplasme suite à l'intégration de signaux apoptotiques impliquant les protéines de la famille des Bcl-2. Les mécanismes connus jusqu'à présent responsables de la relâche du cytochrome c incluent une interaction entre la mitochondrie et des protéines pro-apoptotiques homologues à Bcl-2, l'ouverture des pores de transition de la perméabilité mitochondriale, le gonflement et la rupture de la membrane mitochondriale ou la présence de canaux spécifiques au cytochrome c au niveau de la membrane externe.

L'ancrage de protéines pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2, dont Bax et Bid via des domaines lipidiques dans leur structure est responsable de la formation de

pores dans la membrane externe de la mitochondrie. Une fois le cytochrome c libéré, il s'associe avec la pro-caspase 9 et Apaf-1 pour former l'apoptosome.³⁵² La caspase 9 agit ensuite comme agent initiateur de la cascade des caspases dans la phase d'exécution de l'apoptose. Il est à noter que les voies de signalisation associées aux récepteurs de mort et à la mitochondrie peuvent interagir.

1.4.1.6. Activation des caspases : la phase d'exécution

Les voies de signalisation associées aux récepteurs de mort ou à la mitochondrie convergent vers la formation de complexes intégrant les caspases 8, 10 et 9, respectivement. Une fois activées, qu'elles soient associées à la voie des récepteurs de mort ou mitochondriale, les caspases initiatrices convergent toutes vers un même point : l'activation des caspases effectrices dont la caspase 3, qui constitue la phase de non-retour dans le processus apoptotique.

Les caspases possédant un résidu cystéine à l'intérieur d'une séquence peptidique spécifique. Cette séquence permet à ces protéases de cliver leur substrat de façon spécifique au niveau des résidus aspartate. C'est la nature des acides aminés entourant le résidu aspartate qui détermine la sélectivité des protéases pour les substrats. Une caractéristique importante des caspases, c'est que ces protéases sont exprimées de façon ubiquitaire sous forme de pro-enzymes dans tous les types cellulaires. L'activation nécessite un clivage protéolytique des caspases à des sites spécifiques et généralement, ces mêmes sites sont des substrats pour les caspases. Par conséquent, les caspases sont des enzymes qui peuvent s'activer entre elles, ou s'autoactiver en format des hétéro- ou des homo-dimères, respectivement. La protéolyse associée aux caspases entraîne aussi à l'activation d'enzymes nécessaires au processus apoptotique dont les endonucléases tels que le facteur de fragmentation de l'ADN (DFF : « DNA fragmentation factor »).³⁴⁹

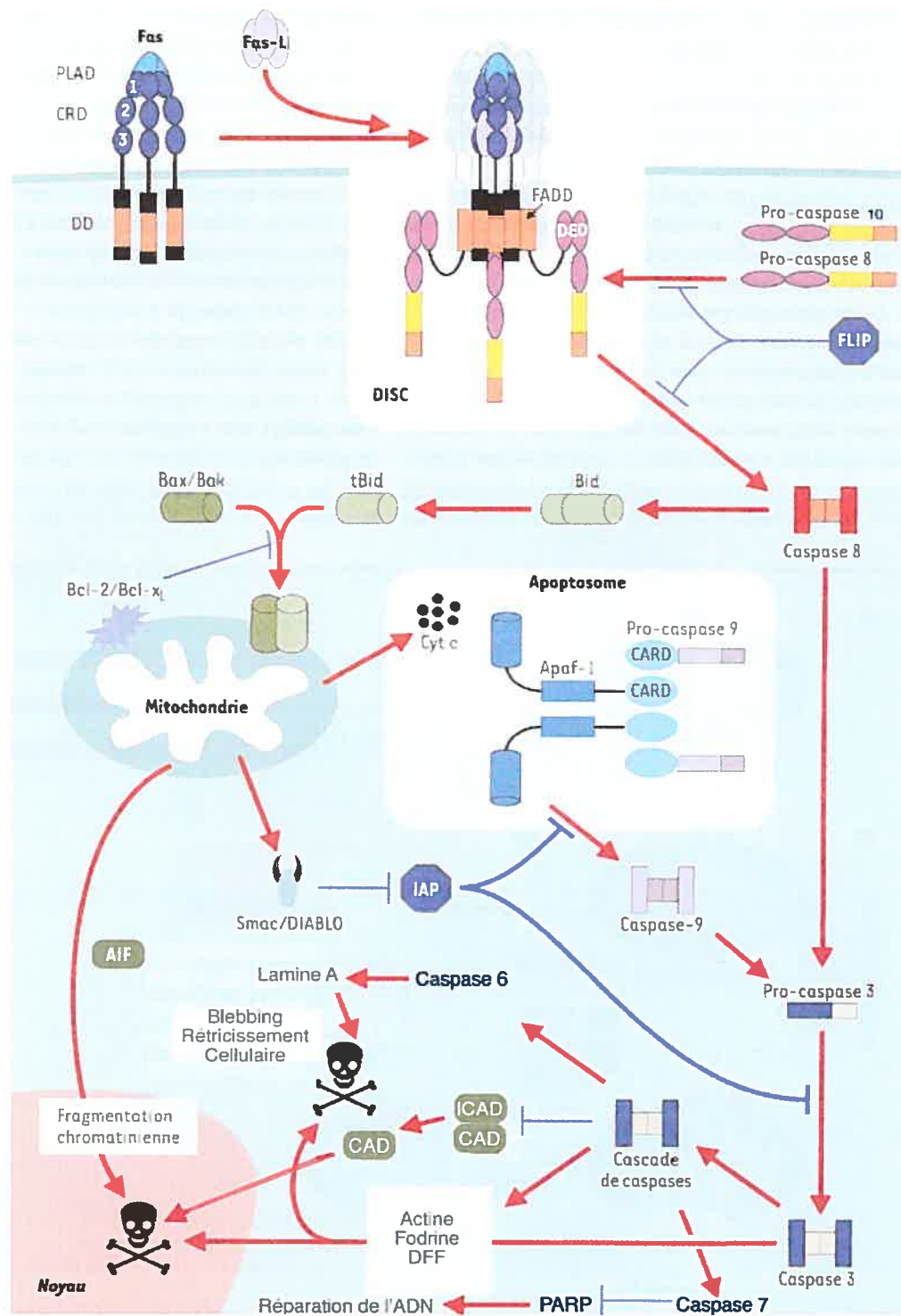


Figure 7 : Schéma récapitulatif des voies apoptotiques. Adapté de Couzinet et al.

1.4.1.7. L'inhibition de l'apoptose: la phase de contrôle

Si toutes les cellules ont les outils nécessaires pour développer le processus apoptotique, elles possèdent aussi des molécules pour l'inhiber. Les inhibiteurs du processus apoptotique sont regroupés en trois classes, soient les protéines d'origine virales telle que CrmA, p35, IAP et FLIP, les membres de la famille Bcl-2 et les peptides synthétiques (e.g. z-VAD-fmk, YVAD-fmk, Ac-DEVD-fmk).³⁴⁹ De plus, il existe maintenant des inhibiteurs non-peptidiques de caspase.^{354,355}

Le contrôle de l'apoptose associée à la voie des récepteurs de mort est ciblé au niveau de l'activation des caspases particulièrement des caspases 8 et 10. Le CrmA (« cytokine response modifier A ») se lie aux sites actifs des caspases et entraîne leur inhibition. CrmA est un inhibiteur efficace de l'apoptose induite par la voie des récepteurs de mort Fas. ^{356,357}

L'apoptose médiée par la voie mitochondriale peut être contrôlée soit au niveau de l'intégrité membranaire de la mitochondrie ou au niveau de l'activation de la caspase 9. La famille des protéines Bcl-2 joue un rôle important au niveau de la phase de contrôle de l'apoptose.³⁵⁸ Les membres de cette famille peuvent être divisés en deux groupes. La première catégorie comprend les protéines anti-apoptotiques ou antagonisant la mort cellulaire (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Bfl-2, Bcl-1, Mcl-1 et A1), alors que la seconde catégorie englobe les protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bcl-x_s, Bad, tBid, Bik).³⁵¹ La réponse de la cellule à certains signaux initiateurs d'apoptose est déterminée par le ratio entre les protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotique. Le « rhéostat » de la vie/mort cellulaire est déterminé en partie par la dimérisation compétitive de paires spécifiques de protéines pro- et anti-apoptotiques, lesquelles s'associent elles-mêmes ou avec Bcl-2.³⁵¹ Du point de vue mécanistique, les protéines de la famille Bcl-2 exercent un contrôle du processus apoptotique via l'intégrité de la

membrane mitochondriale qu'elles peuvent soit maintenir ou perturber. Un surplus de protéines pro-apoptotiques entraîne la perturbation de l'intégrité membranaire de la mitochondrie suite à leur ancrage permettant la relâche de cytochrome c.³⁵⁹⁻³⁶¹ De plus, il a été suggéré que la signalisation via les récepteurs des facteurs de croissance et les cascades de kinases influencent la phosphorylation des protéines de la famille Bcl-2. La phosphorylation de Bcl-2 empêche ces protéines de dimériser et donc affecte le rhéostat de mort cellulaire.

1.4.1.7.1. Inhibiteurs généraux de caspases

Les inhibiteurs généraux des caspases comprennent des inhibiteurs naturels et synthétiques. Il existe des inhibiteurs naturels qu'on retrouve dans la cellule en temps normal. Le p35 est une protéine virale dont la fonction principale semble être l'inhibition du processus apoptotique dans les cellules suite à une infection. Les caspases reconnaissent le p35 comme un substrat et une fois clivé, le p35 se dissocie très lentement ou pas du tout du site actif des caspases entraînant ainsi leur inhibition.

Les peptides synthétiques ont un mode d'action similaire; ils se fixent au niveau du site catalytique des caspases actives où ils bloquent l'accès aux substrats endogènes inhibant ainsi l'activité enzymatique. Ces inhibiteurs sont généralement des tripeptides ou tetrapeptides tels le z-VAD-fmk et le YVAD-fmk.

Diverses compagnies pharmaceutiques consacrent beaucoup d'efforts à l'heure actuelle au développement d'inhibiteurs sélectifs des caspases avec un but thérapeutique. Ces efforts ont permis le développement d'une nouvelle génération d'inhibiteurs de caspases non-peptidiques.^{354,355} Cette nouvelle classe d'agents semble très prometteuse quant à la spécificité et la sélectivité pour les diverses caspases.

1.4.1.8. La fragmentation de l'ADN: la phase de dégradation

La fragmentation spécifique de l'ADN chromosomique est la conséquence de l'activation des DNAses par les caspases. Ceci est un phénomène spécifique au processus apoptotique entraînant la génération de gros fragments (20-50 kpb) suivi d'oligomères de grosseur proportionnels à celle d'un nucléosome (environ 180 paires de bases) et de ses multiples.^{337,341,362} Il a été démontré que la fragmentation internucléosomale de l'ADN dépend de deux molécules qui interagissent ensemble, soient la CAD («caspase-activated DNase») et son inhibiteur ICAD. Les données actuelles suggèrent que ces deux protéines existent sous forme de complexe. Lors de la cascade d'activation des caspases dont la caspase 3 clivent ICAD pour libérer CAD, laquelle est transloquée au noyau où elle dégrade l'ADN chromosomique.³⁶³ Comme ICAD inhibe sélectivement CAD et qu'elle n'a aucun effet inhibiteur sur les DNase I et II, il a été suggéré que la CAD soit responsable de la dégradation de l'ADN associée au processus apoptotique.

D'autres DNAses sont aussi impliquées dans certaines circonstances.³⁶³ La protéine humaine DFF est constituée de deux sous-unités (45K et 40K) et cause la fragmentation de l'ADN dans des cellules stimulés avec la caspase 3. De plus, la protéine p53, le produit d'un gène supresseur de tumeur est essentielle à l'induction du processus apoptotique initié par des signaux de dommages à l'ADN chromosomique. La protéine p53 se lie à l'ADN et induit la transcription d'un gène codant la protéine CDK2 (« cyclin-dependant kinase 2 »), aussi impliquée dans le cycle cellulaire. CDK2 empêche la progression du cycle cellulaire de la phase G₁ à S et par conséquent, empêche la réplication de l'ADN endommagé. La conséquence de cet arrêt du cycle est soit une période prolongée en phase G₁ (possibilité de réparation des dommages à l'ADN), ou la mort de la cellule par apoptose si les dommages chromosomiques ne peuvent être réparés.

Un déficit de p53 induit des effets similaires à ceux qui sont associés à la surexpression de Bcl-2.

Tableau V : Résumé des molécules pro-apoptotiques et leur contrepartie anti-apoptotiques lorsque applicable.

Molécules pro-apoptotiques	Molécules anti-apoptotiques
Ligand Fas	
Céramide	
Caspases 8 et 10	Crma
Caspase 9	
Bax, Bad, tBid, Bak, Bcl-x _s , Raf-1	Bcl-2, Bcl-x _L , Bcl-w, Bfl-1, Bag-1, Mcl-1
Cytochrome c	
Caspase 3	Ac-DEVD
CAD, DFF	ICAD
p53	
	p35, z-VAD, Ac-YVAD

Suite à la formation des corps apoptotiques, les cellules sont phagocytées par des macrophages ou par des cellules avoisinantes. Les corps apoptotiques sont désassemblés et leurs unités chimiques sont réutilisées par les cellules phagocytaires. Pour favoriser le mécanisme d'élimination cellulaire, les cellules apoptotiques ont une altération de leur chimie de surface, c'est-à-dire des phospholipides, notamment les phosphatidylsérines, exprimées à la surface externe de leur membrane plasmique, permettant aux cellules phagocytaires de les reconnaître.

1.4.2. Méthodes pour évaluer l'apoptose

Plusieurs techniques ont été mises au point pour détecter et mesurer l'apoptose. Celles-ci ont recours à différentes caractéristiques du processus apoptotique et

peuvent être appliquées sur des cellules en culture ou sur des tissus animaux ou humains. Nous parlons ainsi des méthodes morphologiques, basées sur le marquage de l'ADN fragmenté et sur la détection de protéines apoptotiques.

1.4.2.1. Méthodes morphologiques

L'analyse qualitative et visuelle à l'aide de la microscopie optique et/ou électronique permet la visualisation des changements morphologiques des cellules. Cette méthode permet la distinction entre les cellules apoptotiques et nécrotiques.

1.4.2.2. Méthodes basées sur le marquage de l'ADN fragmenté

Tel que discuté dans les sections précédentes, le processus apoptotique est accompagné d'un clivage enzymatique de l'ADN entre les nucléosomes générant des fragments de multiples d'approximativement 180 paires de base. Les bouts 3'-OH de ces fragments peuvent être marqués en utilisant l'enzyme terminal déoxynucléotidyltransférase (tdt), à partir de l'ADN extrait de tissus ou *in situ* sur des coupes histologiques (essai TUNEL : « tdt-mediated dUTP nick-end labeling »). À partir de l'ADN extrait, les fragments sont marqués avec un nucléotide radioactif et sont séparés sur gel d'agarose pour démontrer un profil typique à l'apoptose, soit un motif d'échelle connu sous le nom de « DNA laddering », permettant une quantification relative de l'apoptose entre différents groupes expérimentaux..³³⁷

Les techniques *in situ* sont pratiques car elles permettent de déterminer la distribution tissulaire des cellules apoptotiques, la quantification absolue de noyaux apoptotiques, ainsi que la distinction du type cellulaire apoptotique. Cependant, la tdt peut marquer des cellules non-apoptotiques qui sont dans le processus de synthèse d'ARN³⁶⁴ et de réparation d'ADN.³⁶⁵ C'est alors qu'il peut s'avérer avantageux de combiner le marquage d'ADN extrait et *in situ* de même que le décompte cellulaire stéréologique pour avoir une bonne quantification de l'apoptose.

Enfin, des agents intercalants de l'ADN tel les fluorochromes Hoescht,^{366,367} l'acridine orange,³⁶⁸ l'iodure de propidium³⁶⁹ ou le DAPI³⁷⁰ peuvent être administrés par injection iv avant sacrifice de l'animal et la fluorescence peut être quantifiée *in situ*. Seul les cellules ayant une perte d'intégrité membranaire, qui représente un critère de l'initiation de la mort cellulaire, ont l'incorporation de ces colorants spécifique dans leur ADN. Cependant, cette méthode ne permet pas une distinction nette entre les cellules apoptotiques et nécrotiques.

1.4.2.3. Méthodes basées sur la détection de protéines apoptotiques

Le développement d'inhibiteurs spécifiques des caspases a permis de mesurer leur activité enzymatique à partir d'extraits protéiques et par conséquent à déterminer leur contribution relative dans le processus apoptotique. Alternativement, cela peut être fait en utilisant la technique d'immunobuvardage (Western Blot) avec des anticorps spécifiques aux formes actives des caspases sur des extraits protéiques. Cette technique est aussi fréquemment utilisée pour déterminer les niveaux d'expression des différentes protéines pro- et anti-apoptotiques tels que Bax et Bcl-2. Par immunohistochimie, il est possible d'évaluer la distribution tissulaire de ces protéines, mais il est difficile de quantifier l'apoptose de façon absolue.

1.4.3. Potentiel thérapeutique de la modulation de l'apoptose

À ce jour, diverses thérapies expérimentales visant l'inhibition de l'apoptose dans certains types cellulaires sont en voie de développement. Ces thérapies pourraient entraîner des bénéfices dans des situations pathologiques où il y a suractivation de l'apoptose.³⁴⁹ Dans cette optique, la cascade des caspases responsable de la phase d'exécution de l'apoptose, représente une cible thérapeutique intéressante. Cet intérêt pour les caspases a entraîné la génération de divers inhibiteurs peptidiques et non-peptidiques qui sont aussi utilisés comme outils dans l'étude du processus apoptotique. Certains de ces inhibiteurs des caspases se sont avérés

efficaces dans différents modèles d'AVC, d'infarctus et de dommages hépatiques³⁷¹⁻³⁷³ en sauvant les cellules d'une mort apoptotique et en sauvegardant leur fonctionnalité. Ceci suggère que cette stratégie thérapeutique semble non-seulement prévenir, mais aussi guérir les dommages tissulaires. Par contre, l'activation sélective des caspases en vue de stimuler l'apoptose de types cellulaires spécifiques dans les pathologies associées à une inhibition de l'apoptose semble beaucoup plus laborieuse et demeure encore hypothétique.³⁴⁹ Par contre, plusieurs groupes ont rapporté que l'augmentation de l'apoptose dans le système cardiovasculaire contribue aux effets bénéfiques de certaines thérapies sur la structure des organes cibles dans l'hypertension artérielle,^{92,248} ce qui représente un point central dans les résultats de cette thèse.

1.4.3.1. L'apoptose et l'hypertension

Hamet et al. ont suggéré que le remodelage et l'hypertrophie/hyperplasie cellulaire des organes cibles dans l'hypertension sont entraînés par une élévation des taux de prolifération et d'apoptose cellulaires.³⁷⁴ Ce groupe a mis en évidence une apoptose cardiaque modulable selon l'âge dans deux modèles d'hypertension soient le SHR et le SHM (« spontaneously hypertensive mouse »). Ce phénomène a été identifié comme la fenêtre apoptotique ou « apoptotic time window ».^{245,246}

Divers groupes ont rapporté une élévation de l'apoptose basale dans le cœur et les artères mésentériques de SHR.^{375,376} Suite à la déprivation en sérum, les CML vasculaires provenant de SHR-SP ont démontré une augmentation de l'incidence de l'apoptose comparé aux cultures provenant de WKY.³⁷⁷ Ces études ont démontré une association entre l'augmentation de l'apoptose et la susceptibilité des cellules à ce processus dans des modèles animaux où l'hypertension artérielle était déjà établie. Par conséquent, existe-t-il une relation entre le développement de l'hypertension artérielle et l'apoptose?

Il a été démontré que les niveaux élevés d'apoptose observés dans les artères mésentériques de SHR adultes sont absents chez les jeunes SHR dont la pression artérielle est encore normale en bas âge.³⁷⁶ L'évaluation par deux méthodes indépendantes a permis d'observer une diminution de l'apoptose cardiaque chez les SHR nouveaux-nés et très jeunes par rapport aux SHR adultes.^{246,378,379} Par ailleurs, Liu et al ont observé une augmentation de l'apoptose dans le cœur de jeunes SHR précédant le développement de l'hypertension artérielle.³⁷⁵ L'implication de l'augmentation de la pression artérielle sur l'apoptose a aussi été évaluée dans des modèles de coarctation thoracique qui entraînent une élévation subite et substantielle de la pression artérielle.³³¹ Ces études ont démontré une association entre l'élévation de la pression artérielle et la prolifération des CML vasculaires, par contre aucun changement des taux d'apoptose n'a été observé.³⁸⁰ Par ailleurs, chez le rat hypertendu DOCA-sel (« deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rat ») un modèle d'hypertension secondaire, la diminution de la pression artérielle induite par les antagonistes des récepteurs ETA de l'endothéline n'est pas associée à une diminution des taux élevés d'apoptose dans l'aorte.³⁸¹ Finalement, l'impact de la pression artérielle sur les taux élevés d'apoptose dans les CML vasculaires de SHR a été évalué à l'aide de quatre agents antihypertenseurs affectant différents mécanismes de la régulation de la pression artérielle. Ces études ont démontré qu'après quatre semaines de traitement, la pression artérielle des animaux avait été significativement réduite par tous les médicaments. Par contre, seulement trois des quatre agents avaient induit une augmentation transitoire des taux d'apoptose dans l'aorte.²⁴⁸ Dans l'ensemble, ces données suggèrent une dissociation entre les déterminants de l'apoptose et la pression artérielle dans les modèles expérimentaux d'hypertension essentielle.

1.5. OBJECTIFS GÉNÉRAUX DE LA THÈSE

Les médicaments antihypertenseurs ont non seulement le pouvoir de réduire la pression artérielle mais aussi d'altérer la structure cardiovasculaire. Ces agents dits « antiprolifératifs » peuvent normaliser l'hypertrophie cardiovasculaire qui représente une condition pathologique de l'hypertension. La composante de l'hypertrophie cardiovasculaire associée à la réplication d'ADN est beaucoup moins facilement réversible que la composante due à l'accumulation de la matrice extracellulaire ou l'augmentation de la masse sans synthèse d'ADN *de novo*. Ainsi, l'hypertrophie due à l'augmentation du contenu en ADN, ou l'hyperplasie, peut-être uniquement réversible par la mort cellulaire. Un mécanisme potentiel est le processus génétiquement régulé d'auto-destruction cellulaire nommé *apoptose*.

Notre laboratoire a été le premier à démontrer que certains médicaments antihypertenseurs, notamment les bloqueurs du SRA, pouvaient stimuler l'apoptose durant la régression de l'hypertrophie des organes cibles de l'hypertension chez le SHR. Ainsi, les objectifs spécifiques de cette thèse sont :

- 1) Identifier le type cellulaire apoptotique lors de la régression de l'hypertrophie du coeur induit par les bloqueurs du SRA dans notre modèle.

Dans une étude antérieure provenant de notre groupe, nous avons démontré l'implication du récepteur pro-apoptotique AT₂ dans l'induction de l'apoptose des CML aortiques dans ce même modèle (annexe).

- 2) Ainsi, nous avons étudié en deuxième partie le rôle de ce récepteur dans l'apoptose stimulé dans le coeur.

Dans la même étude antérieure, alors que l'antagonisme simultané des récepteurs AT₁ et AT₂ n'a produit aucune réponse, l'atténuation de la signalisation à ces deux sous-types par les iECA a stimulé l'apoptose des CML aortiques (annexe). Connaissant que les iECA corrigent la dysfonction endothéliale qui elle représente une caractéristique importante de l'hypertension et du remodelage, et

que la restauration de cette fonction pourrait contribuer à la régression de la masse vasculaire,

3) nous avons étudié en troisième partie, le rôle de la correction de la dysfonction endothéliale dans l'apoptose des CML aortique stimulé par les iECA.

CHAPITRE 2

REVERSAL OF INTERSTITIAL FIBROBLAST HYPERPLASIA VIA APOPTOSIS IN HYPERTENSIVE RAT HEART WITH VALSARTAN OR ENALAPRIL

Shant Der Sarkissian¹, Eve-Lyne Marchand¹, David Duguay¹,

Pavel Hamet² & Denis deBlois^{1, 3}

Departments of pharmacology¹ and medicine², University of Montreal,

University of Montreal Hospital (CHUM) Research Center

3840, St-Urbain St., room 7-132B, Montreal, Quebec H2W 1T8, Canada

Tel. (514) 890-8000 ext. 12919, Fax :(514) 412-7152, email:

[REDACTED]

Short title: Der Sarkissian et al., Deletion of cardiac fibroblasts by apoptosis

Key words: experimental, heart, multicellular, pharmacology, hypertension, hypertrophy, antihypertensive agents, angiotensin, apoptosis

³Author for correspondence

Supported by the Canadian Institutes of Health Research (MOP-4252)

Word count: 5429

2.1. ABSTRACT

Objective: Renin-angiotensin system inhibitors transiently induce apoptosis at the onset of cardiac hypertrophy regression in spontaneously hypertensive rats (SHR). The focus of this study is to evaluate the cell selectivity of this response. *Methods:* 10 week-old SHR were treated with valsartan or enalapril ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$) or placebo for 1 to 4 weeks. Stereological and morphological data were obtained from immunohistological analyses. Apoptosis was quantified by DEVDase (caspase-3-like) activity assay and immunoblot analysis of apoptosis-regulatory proteins (Bax and Bcl-2). Identification of the apoptotic cell type was conducted using *in situ* TUNEL labeling, in conjunction with α -sarcomeric actin or lectin immunoreactivity as markers for cardiomyocytes and endothelial cells respectively. *Results:* Stereological analysis of the left ventricle revealed significant non-cardiomyocyte hyperplasia in placebo-treated SHR ($239 \pm 29 \times 10^6$ nuclei) as compared to untreated age-matched normotensive Wistar-Kyoto (WKY) rats ($107 \pm 12 \times 10^6$). In contrast, the number of cardiomyocyte nuclei was comparable between untreated SHR ($48 \pm 4 \times 10^6$) and WKY rats. After 4 weeks of valsartan or enalapril treatment, SHR showed significant reductions in systolic blood pressure ($>28\%$), left ventricular hypertrophy ($>9\%$) and cardiomyocyte cross-sectional area ($>17\%$). Moreover, these treatments abolished non-cardiomyocyte hyperplasia in SHR left ventricle without affecting cardiomyocyte number, capillary density or number of capillary per cardiomyocyte nucleus. As a mechanism of cell deletion consistent with apoptosis induction, ventricles showed increased caspase-3 activation (>4.5 -fold) as well as Bax to Bcl-2 protein ratio (>3.2 -fold) within 2 weeks of valsartan or enalapril treatment. Immunohistological analysis revealed a significant increase in TUNEL-positive, lectin-negative non-cardiomyocytes, suggesting a rise in apoptotic interstitial fibroblasts in the left ventricle within 2 weeks of treatment with valsartan or enalapril ($>63\%$), with a return to baseline

($0.033 \pm 0.003\%$) at 4 weeks. Treatments did not affect right ventricular mass, apoptosis or cellularity. *Conclusion:* Cardiac apoptosis induction during regression of left ventricular hypertrophy reverses interstitial fibroblast hyperplasia in SHR treated with inhibitors of the renin-angiotensin system.

2.2. INTRODUCTION

In recent years, apoptosis, a gene-regulated process of cell self-destruction associated with caspase activation and internucleosomal DNA fragmentation, has emerged as an important mechanism contributing to cardiac remodeling.^{1,2} Several studies have associated enhanced levels of apoptosis with the pathogenesis of cardiac disease, e.g., in the loss of cardiomyocytes and neurons leading to heart failure and cardiac conduction system disorders.³⁻⁵ However, the role of apoptosis in cardiac remodeling is context-dependent and may participate in normal cardiac remodeling as illustrated by the differential regulation of cardiomyocyte apoptosis between the right and left ventricles during the post-natal period.⁶

The spontaneously hypertensive rat (SHR) is a model of primary hypertension in which an imbalance between cell growth and apoptosis favors increased cardiac mass and DNA content in neonates and adults.⁷⁻⁹ Adult SHR show cardiac fibroblast hyperplasia¹⁰, a common feature of pathological cardiac remodeling leading to increased extracellular matrix deposition and cardiac fibrosis.^{11,12} With aging, the hypertensive heart also shows increased cardiomyocyte apoptosis^{4,13,14}, a feature that is attenuated following angiotensin converting enzyme inhibition or angiotensin II type 1 (AT₁) receptor

blockade.^{4,10,14,15} Liu et al¹⁰ reported an age-dependent increase in cardiac apoptosis in young SHR, mainly in cardiomyocytes, concomitant with the development of fibroblast hyperplasia. Prophylactic treatment of hypertension with the angiotensin converting enzyme inhibitor ramipril reduces cardiac apoptosis in the long term and prevents the development of fibroblast hyperplasia.¹⁰ Likewise, initiating hydralazine treatment during the pre-hypertensive phase can prevent the development of cardiac hyperplasia in SHR (deBlois et al, unpublished data). In contrast, hydralazine does not reverse cardiac hyperplasia in adult SHR.¹⁶ A key question is whether established fibroblast hyperplasia can be reversed in the hypertensive adult. We previously reported that a transient increase in apoptosis occurs at the onset of cardiac hypertrophy regression in SHR.¹⁶ In this model, internucleosomal fragmentation of ventricular DNA peaks at 1 week of treatment with an AT₁ receptor antagonist, or at 2 weeks of treatment with an equipotent antihypertensive dose of an angiotensin converting enzyme inhibitor. Current evidence suggests that angiotensin II regulation of apoptosis in the heart is cell type-specific. *In vitro*, angiotensin II increases cardiomyocyte apoptosis, an effect dependent on AT₁ receptor activation.^{17,18} In contrast, cultured cardiac fibroblasts undergo AT₁ receptor-dependent proliferation in response to angiotensin II.¹⁹

We therefore postulated that the early phase of cardiac hypertrophy regression induced by inhibitors of the renin-angiotensin system in adult SHR involved the selective deletion of fibroblasts via apoptosis. The present study provides evidence for a beneficial role of selective apoptosis up-regulation in cardiac remodeling induced by anti-hypertensive treatments, namely the reversal of fibroblast hyperplasia.

2.3. METHODS

Animal procedures

Forty-two male SHR and 6 male Wistar-Kyoto (WKY) rats (10 week-old; weighing ~250 g) were purchased from Charles-River (St-Constant, Canada) and housed for at least 1 week before treatment. Food and water were administered ad libitum. SHR (n=6/group) were randomly assigned to treatment with the selective AT₁ antagonist valsartan (30 mg⁻¹·kg⁻¹·day⁻¹ p.o.; gift of Novartis, Toronto, ON) or the angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril (30 mg⁻¹·kg⁻¹·day⁻¹ p.o.; Sigma Chemicals, St-Louis, MO) in the drinking water for 1, 2 or 4 weeks. Control SHR and WKY rats received vehicle. Systolic blood pressure was determined by the tail-cuff method at 12 and 26 days of treatment (n=6/group) and tissues were isolated after 1 and 2 weeks as we described previously.¹⁶ Briefly, rats were anesthetized with a single i.m. injection of ketamine (80 mg·kg⁻¹; Ayerst, Guelph, ON), xylazine (4 mg·kg⁻¹; Bayer, Etobicoke, ON), and acepromazine (2 mg·kg⁻¹; Ayerst, Montreal, QC), and killed by exsanguination via the jugular vein. Both ventricles were isolated together, weighed and an equatorial cross-section (3 mm) was fixed in paraformaldehyde (4%). In SHR killed after 4 weeks of treatment and age-matched WKY (n=6/group) anesthesia was followed by an i.v. injection of 1.5 mL KCl (100 mmol·L⁻¹) via the vena cava to induce diastolic cardiac arrest. Ventricles were isolated together, weighed and fixed overnight in 4% paraformaldehyde. Equatorial cross-sections of ventricles were paraffin-embedded. All animal manipulations were conducted in accordance with the Care and Use of Laboratory Animals guidelines published by the National Institutes of Health (NIH).

Hypertrophy and hyperplasia measurements

We used the NIH Image 1.61 program (<http://rsb.info.nih.gov/ni-image/>) to measure the cross-sectional area of the ventricles, ventricular chambers and cardiomyocytes at 4 weeks. Three sets of randomly chosen pictures (from the left and right ventricular sub-epicardium, sub-endocardium and mid-myocardium) were captured from hematoxylin stained histological sections and digitally enhanced. The total number of cardiomyocytes within each ventricle was assessed stereologically as per Anversa et al.²⁰ A similar procedure was used to calculate total non-cardiomyocyte number with the exception that the area covered by the (unstained) cell body of non-cardiomyocytes was estimated using the average nuclear length measurements ($10.5 \pm 0.3 \mu\text{m}$ in controls; no change with treatment), extended half a time in the x and y axes around each nucleus.

DEVDase activity

Ventricles were pulverized in liquid nitrogen and an aliquot (5 mg) was lysed to measure DEVDase activity using the fluorogenic substrate DEVD-AMC (40 μM) in the presence or absence of the Ac-DEVD-CHO (1 μM), a caspase-3 inhibitor as previously described.²¹ Caspase-3-like activity was defined as the Ac-DEVD-CHO-sensitive activity.

Expression of apoptosis-regulatory proteins

The protein levels of active caspase-3 17-20 kDa fragments, Bcl-2 and Bax in cardiac tissue were examined by Western Blot analysis. Total heart was pulverized in liquid nitrogen and a 50 mg aliquot was lysed in extraction buffer (10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH 7.5, 1% Triton X-100, 4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -glycerophosphate, 4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium fluoride, 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

¹ EGTA, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium orthophosphate, 51 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ benzamidine, 0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ phenylmethylsulfonylfluoride, 21 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ leupeptin, 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT and 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ microcystin (Sigma-Aldrich, Oakville, ON)). Western Blot was carried out with equal amounts of proteins (25 μg) loaded onto a 15% SDS-polyacrylamide gel and transferred to Hybond-C extra membrane (Amersham Bioscience, London, UK). Membranes were hybridized with anti-caspase-3 (1:1000; BD Pharmingen, Mississauga, ON), anti-Bax or anti-Bcl-2 (1:1000; Santa-Cruz Biotech, Santa-Cruz, CA,) antibodies followed by incubation with goat anti-rabbit (caspase-3) or goat anti-mouse (Bax, Bcl-2) horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:2000; Santa-Cruz Biotech) according to manufacturer's protocol. Membranes were then incubated with ECL Plus (Life Science Products, Boston, MA), exposed to film and developed. The image was digitized and band intensity was quantified using NIH Image 1.61 program. For caspase-3, the 32 kDa (procaspase-3) and 17-20 kDa (indicative of enzyme activation) fragments were measured.

Immunohistochemistry

Quantification of apoptotic nuclei was conducted in deparaffinized ventricular cross-sections (5 μm) using a three-step *in situ* fluorescent labeling protocol as per Cigola et al¹⁷ with minor modifications. As a first step, *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase (tdt)-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) of nuclei was used as a marker of apoptosis. Modifications from the published protocol¹⁷ included pre-incubation at room temperature for 15 min in a 0.1% saponin-EGTA solution, amount of tdt enzyme (20 units; Roche, Indianapolis, IN), biotin-16-dUTP (0.5 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; Roche) and FITC-labeled Extravidin (0.06 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; Sigma Chemicals, St-Louis, MO). Negative controls had water instead of tdt. As a second step, immunoreactivity for α -sarcomeric actin was used as a marker for cardiomyocytes. A primary mouse IgG antibody

directed against α -sarcomeric actin (1:40; 5C5 clone, Sigma Chemicals) and a TRITC-labeled goat IgG secondary antibody directed against mouse IgG (1:100; Sigma Chemicals) were used. As a third step, 5 nmol·L⁻¹ propidium iodide (ICN Biomedicals, Aurora, OH) was used for total cardiac nuclei staining. In a duplicate set of sections, endothelial cells were labeled using 5 μ g·mL⁻¹ TRITC-labeled lectin (*Bandeiraea Simplicifolia*; Sigma Chemicals) and TUNEL positive nuclei were labeled using 0.1 μ g·mL⁻¹ AMCA-labeled Streptavidin (Vector Laboratories). Appropriate filters were used to quantify labeled cells by fluorescence microscopy separately in right and left ventricles. All TUNEL-positive nuclei (cardiomyocyte, non-cardiomyocyte: endothelial and fibroblast) in each section were counted. The epicardium was analyzed separately. Total number of cell specific nuclei per cross-section was estimated by counting profiles in 3 randomly chosen fields from both ventricles (250X; 0.02 mm²/field) and multiplying the average numerical density by the ventricular cross-sectional area. An average of 500 endothelial cell profiles were counted for each rat and results were expressed as number of capillaries/mm². In the epicardium, all nuclei were counted. A separate set of sections were stained with Sirius red to evaluate the percentage of ventricular area occupied by collagen.²²

Statistical Analysis

Results were analyzed using analysis of variance and unpaired Student's t test with Bonferroni correction for multiple comparisons where appropriate. TUNEL assay was analyzed with the nonparametric Mann-Whitney test. Values are presented as mean \pm SEM. P<.05 was considered statistically significant.

2.4 RESULTS

Systolic blood pressure (mm Hg) was significantly decreased by therapy after 12 days (controls: 206 ± 9 ; valsartan: 166 ± 10 ; enalapril: 155 ± 9) and 26 days (controls: 212 ± 10 ; valsartan: 152 ± 8 ; enalapril: 148 ± 9). Body weight was not significantly affected after 4 weeks of treatment with valsartan (285 ± 12 g) or enalapril (277 ± 11 g), compared with controls (295 ± 14 g), whereas left ventricular weight to body weight ratio was significantly reduced with valsartan ($>9\%$) and enalapril ($>17\%$).

Morphological data obtained on equatorial sections of diastole-arrested hearts are shown in Table 1. As compared to WKY rats, untreated SHR showed increased left ventricular cross-sectional area and cardiomyocyte cross-sectional area. SHR tended to have a (non-significant) larger chamber cross-sectional area in left ventricle as compared to WKY rats. Unexpectedly, the only difference in relative collagen content was in the right ventricle of WKY rats where there was a slight increase over SHR. After 4 weeks, valsartan tended to reduce and enalapril completely normalized left ventricular cross-sectional area without affecting ventricular chamber size or right ventricular parameters. Valsartan and enalapril significantly decreased cross-sectional area of left ventricular cardiomyocytes down to levels observed in WKY rats. The relative collagen content in either ventricle of SHR was maintained after valsartan or enalapril for 4 weeks. Ultimately, both valsartan and enalapril significantly decreased the total number of non-cardiomyocytes in the left ventricle by 37% ($P=0.002$). Levels reached that of age-matched normotensive WKY rats ($107 \pm 12 \times 10^6$) without affecting the total number of cardiomyocyte nuclei at 4 weeks (Figure 1A). Thus, the ratio of cardiomyocyte to non-cardiomyocyte nuclei, which was low in controls (0.17 ± 0.01), was normalized with valsartan (0.24 ± 0.01 ;

$P < 0.01$) and enalapril (0.25 ± 0.02 ; $P < 0.01$) and increased to values similar to those of the WKY rats (0.22 ± 0.02 ; $P < 0.05$ versus control SHR). In contrast, the right ventricle showed no significant change in cellularity with therapy (Figure 1B). At 4 weeks, capillary density (capillary/mm²) and capillaries per myocyte in the left ventricular myocardium remained unchanged by treatments (versus respective controls: 1405 ± 39 and 1.01 ± 0.05 , Figure 1C, 1D). The absolute number of epicardial cells per cross-section at 4 weeks was reduced, though the change was not significant (valsartan: 559 ± 85 ; enalapril: 676 ± 58 ; controls: 756 ± 91 ; NS).

Our previous time course studies showed that DNA fragmentation indicative of apoptosis is maximally increased in the SHR heart after 1 week of AT₁ antagonist treatment and 2 weeks of angiotensin converting enzyme inhibitor treatment during regression of hypertrophy.¹⁶ Thus, these time points for valsartan (1 week) and enalapril (2 weeks) were selected for apoptosis study and *in situ* determination of cell type undergoing apoptosis in the ventricles.

Consistent with these previous observations, ventricular DEVDase (caspase-3-like) activity was increased by more than 4.5-fold after 1 week of valsartan or 2 weeks of enalapril treatment (Figure 2A). These results were corroborated with immunoblot analyses showing transient 3.6 and 4.2-fold increases in caspase-3 cleavage fragments (bands at 17-20 kDa) with valsartan and enalapril respectively, without alteration in pro-caspase-3 (32 kDa) expression levels (not shown). In addition, measurement of cardiac pro- (Bax) and anti-apoptotic (Bcl-2) protein levels showed significant 3.4 and 3.2-fold increases in the Bax to Bcl-2 ratio with valsartan and enalapril respectively (Figure 2B).

Figure 3A shows a representative photomicrograph of an area within the

myocardium in which all (propidium iodide-positive) nuclei appear in bright red, well delineated spots, whereas nuclei within the α -sarcomeric actin-positive area (diffuse red area) were identified as cardiomyocyte nuclei. In Figure 3B, the same field examined under a green filter to detect FITC-labeling shows a TUNEL-positive non-cardiomyocyte nucleus. For each animal, a subset of sections was stained for identification of endothelial cells using lectin as a marker (bright red spots in Figure 3C). In Figure 3D, the same field examined under a blue filter to detect AMCA-labeling shows a TUNEL-positive, lectin-negative nucleus, considered as an apoptotic fibroblast. Treatment with valsartan for 1 week or enalapril for 2 weeks each caused a significant 2-fold increase in TUNEL-positive fibroblasts (Figure 4A) selectively in the interstitium of the left ventricle. In contrast, TUNEL-positive endothelial nuclei remained unchanged versus controls (Figure 4B). TUNEL-positive fibroblasts returned to basal values ($0.026 \pm 0.005\%$) after 4 weeks of valsartan ($0.033 \pm 0.003\%$) or enalapril ($0.034 \pm 0.004\%$) treatment. TUNEL-positive cardiomyocyte nuclei were increased with enalapril at 2 weeks (by 75% in the left ventricle only) (Figure 4C). Valsartan-treated hearts at 1 week showed a similar though non-significant tendency. After 4 weeks, TUNEL-positive cardiomyocyte nuclei were not significantly different between rats treated with placebo ($0.008 \pm 0.002\%$), valsartan ($0.006 \pm 0.001\%$) or enalapril ($0.006 \pm 0.001\%$). As shown in Figure 3E, epicardial cells showed by far the greatest frequency of TUNEL-positive nuclei. TUNEL-positive epicardial cells were increased with valsartan at 1 week ($45 \pm 2\%$ vs $38 \pm 2\%$ in age-matched controls; $P < 0.05$) and enalapril at 2 weeks ($46 \pm 1\%$ vs $32 \pm 2\%$ in age-matched controls; $P < 0.05$), with a return to basal levels at 4 weeks for both treatments (valsartan: $37 \pm 3\%$; enalapril: $35 \pm 3\%$; age-matched controls: $38 \pm 1\%$; NS). Both ventricles showed similar frequencies of TUNEL-positive epicardial cells (not shown).

2.5. DISCUSSION

The present results indicate significant cell deletion by apoptosis during onset of cardiac hypertrophy regression was restricted to interstitial fibroblasts in the left ventricle of SHR treated with valsartan or enalapril. As a result, fibroblast hyperplasia in the adult SHR was normalized within 4 weeks of treatment, down to levels seen in WKY rats. Apoptosis increase was transient even though antihypertensive treatments were maintained, consistent with our previous observations.¹⁶ Both drugs had a tendency to transiently increase TUNEL staining also in cardiomyocytes (significant with enalapril). The cumulative effect was marginal, however, since the total number of cardiomyocyte nuclei was not significantly decreased after 4 weeks of treatment in the left ventricle. Administration of quinapril decreases the percentage of tetraploid cardiomyocytes in SHR,²³ an effect that reflects either nuclear division or polyploid cell deletion. Cardiomyocyte polyploid nuclei may be removed by apoptosis during treatment with renin-angiotensin system inhibitors. Alternatively, TUNEL staining may label nuclei undergoing DNA repair.²⁴ After the 4-week treatments, the number of cardiomyocytes in the right and left ventricles of SHR remained unchanged and higher than in WKY rats, possibly reflecting compensated cardiac hypertrophy in SHR at that age. In humans, right septal endomyocardial biopsies from hypertensive patients show greater caspase-3 immunoreactivity, Bax to Bcl-2 protein ratio and TUNEL staining in both cardiomyocytes and interstitial fibroblasts as compared to tissues from normotensive volunteers.²⁵ These high levels of apoptosis in cardiomyocytes and interstitial fibroblasts are attenuated significantly, though not normalized, following administration of losartan for 12 months. The discrepancy with the present results may reflect species specificities, different stages of the disease or time-dependent regulation of cardiac apoptosis during treatment.

The beneficial effects of angiotensin pathway inhibitors include the amelioration of oxygen diffusion in the left ventricular myocardium. Previous reports show that cardiac capillaries are not decreased in SHR receiving renin-angiotensin system inhibitors.^{26,27} Consistent with this, the treatments in this study did not increase TUNEL-positive endothelial cells or decrease capillary number or density at 4 weeks. In the non-cardiomyocyte population of the heart, fibroblasts, representing the main cell type, play a key role in cardiac connective tissue regulation.²⁸ At the age examined, the left ventricles of SHR did not show evidence of collagen accumulation as compared to WKY rats possibly due to the relatively recent onset of hypertension in SHR. A significant increase in left ventricular collagen content in SHR versus WKY has been reported in some but not all studies.^{29,30} Consistent with a lack of enhanced collagen deposition in untreated SHR left ventricles, these tissues showed no reduction in relative collagen tissue content after 4 weeks of treatment. Since left ventricular mass was reduced, these data suggest a proportional degradation of myocardial fibrillar collagen within the 4-week treatments. The group of Diez et al³¹ recently reported that AT₁ receptor blockade for 14 weeks stimulates collagenase activity and reduces fibrosis in SHR left ventricles. As an additional mechanism, the present data suggest that a reduction of fibroblast hyperplasia may contribute to decreased myocardial extracellular matrix mass.

The induction of fibroblast apoptosis and the reduction in ventricular cross-sectional area occurred only in the left ventricle, suggesting a possible causal relationship between these two processes. The absence of right ventricular apoptosis also suggests a role for blood pressure reduction. It is important to note, however, that effective antihypertensive treatment with hydralazine does not induce cardiac apoptosis or mass regression, suggesting pressure independent influences.¹⁶ We previously reported that transient apoptosis

induction during regression of aortic hypertrophy is dependent on pro-apoptotic AT₂ receptors for angiotensin II in SHR treated with the AT₁ antagonist valsartan but not enalapril.³² We recently observed that transient cardiac apoptosis induced by either valsartan or enalapril was not affected by AT₂ receptor blockade (Der Sarkissian et al, unpublished data), suggesting a role for downregulation of AT₁ receptor signaling in the induction of the time window of cardiac apoptosis in this model. The stimulation of AT₁ receptors activates pro-growth and anti-apoptotic signaling pathways in mesenchymal cells such as fibroblasts and smooth muscle cells, including Akt activation, reactive oxygen species generation, and growth factor expression.^{33,34} One candidate is insulin-like growth factor-1, which is induced by angiotensin II³⁵ and which inhibits apoptosis in cardiac fibroblasts via a mechanism up-stream of caspase-3 but independent of Bax or Bcl-2 expression.³⁶ Cardiac Bax to Bcl-2 ratio was increased during apoptosis in the present study, however, suggesting an alternative pathway. Tissue inhibitor of metalloproteinase-4 (TIMP-4), which shows dysregulated expression during pathological cardiac remodeling,³⁷ was recently shown to induce apoptosis in transformed, although not in normal, cardiac fibroblasts.³⁸ Pathways involved in regulating fibroblast apoptosis during cardiac remodeling remain to be better defined.

The present results confirm our previous observations that cardiac mass regression is associated with induction of apoptosis in the epicardial region.¹⁶ The epicardium, which is part of the cardiac pleura, is populated by mesothelial cells and is a major expression site for matrix metalloproteinases³⁹ and several factors modulating cardiomyocyte and non-cardiomyocyte behavior, including angiotensin II.⁴⁰ The contribution of mesothelial cells to ventricular hypertrophy regression is not clear but may reflect proportional remodeling of the pleura to accommodate the change in ventricular mass. Interestingly, epicardial apoptosis

was similar between the right and left ventricles, thus ruling out a direct causal relationship between these events. Post-operative fibrosis of the cardiac pleura is associated with increased local expression of angiotensin-converting enzyme⁴¹ and AT₁ receptors.⁴² Considering the present findings, it is intriguing to speculate that the suppression of post-operative pericardial fibrosis by AT₁ receptor blockade⁴³ involves enhanced mesothelial cell death by apoptosis. Also intriguing, are the high basal levels of TUNEL-positive mesothelial cells (30% range), which may suggest a high turnover rate.

Several studies showed that inhibition of the renin-angiotensin system decreases cardiomyocyte apoptosis in hypertension.^{4,10,14,15} Considering these findings with the present data, we propose that the beneficial cardiac effects of angiotensin II pathway inhibitors may involve cell type-specific regulation of apoptosis, with an early decrease in fibroblast survival and a long-term increase in cardiomyocyte survival. If confirmed in humans, the ability to reduce fibroblast hyperplasia via apoptosis may have important implications in the treatment of advanced cardiac fibrotic diseases.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Canadian Institute of Health Research (CIHR; MOP-4252). DD is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. SDS and ELM both hold an award from the Heart and Stroke Foundation of Canada / CIHR. We would like to acknowledge the help of Dr. Maria Antonia Fortuno and Dr. Martin G. Sirois in developing the immunochemistry protocols and of Marie-France Ross in conducting the quantitative image analysis.

2.6. REFERENCES

1. Anversa P, Olivetti G, Leri A, Liu Y, Kajstura J. Myocyte cell death and ventricular remodeling. *Current Opinion in Nephrology & Hypertension*. 1997;6:169-176.
2. Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circulation Research*. 1998;82:1111-1129.
3. Anversa P. Myocyte death in the pathological heart. *Circ Res*. 2000;86:121-124.
4. Diez J, Fortuno MA, Ravassa S. Apoptosis in hypertensive heart disease. *Curr Opin Cardiol*. 1998;13:317-325.
5. James TN. Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. *Annu Rev Physiol*. 1998;60:309-325.
6. Kajstura J, Mansukhani M, Cheng W, Reiss K, Krajewski S, Reed JC, Quaini F, Sonnenblick EH, Anversa P. Programmed cell death and expression of the protooncogene bcl-2 in myocytes during postnatal maturation of the heart. *Exp Cell Res*. 1995;219:110-121.
7. Hamet P. Proliferation and apoptosis in hypertension. *Current Opinion in Nephrology & Hypertension*. 1995;4:1-7.
8. Moreau P, Tea BS, Dam TV, Hamet P. Altered balance between cell replication and apoptosis in hearts and kidneys of newborn SHR. *Hypertension*. 1997;30:720-724.
9. Walter SV, Hamet P. Enhanced DNA synthesis in heart and kidney of newborn spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1986;8:520-525.
10. Liu JJ, Peng L, Bradley CJ, Zulli A, Shen J, Buxton BF. Increased

apoptosis in the heart of genetic hypertension, associated with increased fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 2000;45:729-735.

11. Brilla CG, Matsubara L, Weber KT. Advanced hypertensive heart disease in spontaneously hypertensive rats. Lisinopril-mediated regression of myocardial fibrosis. *Hypertension.* 1996;28:269-275.
12. Weber KT. Fibrosis and hypertensive heart disease. *Curr Opin Cardiol.* 2000;15:264-272.
13. Teiger E, Dam TV, Richard L, Wisnewsky C, Tea BS, Gaboury L, Tremblay J, Schwartz K, Hamet P. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *Journal of Clinical Investigation.* 1996;97:2891-2897.
14. Li Z, Bing OH, Long X, Robinson KG, Lakatta EG. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *American Journal of Physiology.* 1997;272:H2313-H2319.
15. Leri A, Claudio PP, Li Q, Wang X, Reiss K, Wang S, Malhotra A, Kajstura J, Anversa P. Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the Bcl-2-to-Bax protein ratio in the cell. *J Clin Invest.* 1998;101:1326-1342.
16. Tea BS, Dam TV, Moreau P, Hamet P, deBlois D. Apoptosis during regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats: temporal regulation and spatial heterogeneity. *Hypertension.* 1999;34:229-235.
17. Cigola E, Kajstura J, Li B, Meggs LG, Anversa P. Angiotensin II activates programmed myocyte cell death in vitro. *Experimental Cell Research.* 1997;231:363-371.

18. Ravassa S, Fortuno MA, Gonzalez A, Lopez B, Zalba G, Fortuno A, Diez J. Mechanisms of increased susceptibility to angiotensin II-induced apoptosis in ventricular cardiomyocytes of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2000;36:1065-1071.
19. Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circulation Research*. 1993;73:413-423.
20. Anversa P, Zhang X, Li P, Capasso JM. Chronic coronary artery constriction leads to moderate myocyte loss and left ventricular dysfunction and failure in rats. *Journal of Clinical Investigation*. 1992;89:618-629.
21. Orlov SN, Thorin-Trescases N, Kotelevtsev SV, Tremblay J, Hamet P. Inversion of the intracellular Na⁺/K⁺ ratio blocks apoptosis in vascular smooth muscle at a site upstream of caspase-3. *J Biol Chem*. 1999;274:16545-16552.
22. Escolar JD, Tejero C, Escolar MA, Montalvo F, Garisa R. Architecture, elastic fiber, and collagen in the distal air portion of the lung of the 18-month-old rat. *Anat Rec*. 1997;248:63-69.
23. Panizo-Santos A, Sola JJ, Pardo-Mindan FJ, Hernandez M, Cenarruzabeitia E, Diez J. Angiotensin converting enzyme inhibition prevents polyploidization of cardiomyocytes in spontaneously hypertensive rats with left ventricular hypertrophy. *J Pathol*. 1995;177:431-437.
24. Kanoh M, Takemura G, Misao J, Hayakawa Y, Aoyama T, Nishigaki K, Noda T, Fujiwara T, Fukuda K, Minatoguchi S, Fujiwara H. Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy: not apoptosis but DNA

- repair. *Circulation*. 1999;99:2757-2764.
25. Gonzalez A, Lopez B, Ravassa S, Querejeta R, Larman M, Diez J, Fortuno MA. Stimulation of cardiac apoptosis in essential hypertension: potential role of angiotensin II. *Hypertension*. 2002;39:75-80.
 26. Zhu YC, Zhu YZ, Gohlke P, Stauss HM, Unger T. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II AT1 receptor antagonism on cardiac parameters in left ventricular hypertrophy. *Am J Cardiol*. 1997;80:110A-117A.
 27. Gohlke P, Linz W, Scholkens B, Van Even P, Martorana P, Unger T. Vascular and cardiac protection by ramipril in spontaneously hypertensive rats: prevention versus regression study [published erratum appears in Br J Clin Pract Symp Suppl 1996 Sep;50(6):293]. *Br J Clin Pract Suppl*. 1996;84:1-10.
 28. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev*. 1999;79:215-262.
 29. Susic D, Francischetti A, Frohlich ED. Prolonged L-arginine on cardiovascular mass and myocardial hemodynamics and collagen in aged spontaneously hypertensive rats and normal rats. *Hypertension*. 1999;33:451-455.
 30. Yu HC, Burrell LM, Black MJ, Wu LL, Dilley RJ, Cooper ME, Johnston CI. Salt induces myocardial and renal fibrosis in normotensive and hypertensive rats. *Circulation*. 1998;98:2621-2628.
 31. Varo N, Iraburu MJ, Varela M, Lopez B, Etayo J, C., Diez J. Chronic AT1 blockade stimulates extracellular collagen type I degradation and reverses myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2000;35:1197-1202.
 32. Tea BS, Der Sarkissian S, Touyz RM, Hamet P, deBlois D. Proapoptotic

- and Growth-Inhibitory Role of Angiotensin II Type 2 Receptor in Vascular Smooth Muscle Cells of Spontaneously Hypertensive Rats In Vivo. *Hypertension*. 2000;35:1069-1073.
33. Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. Superoxide induces apoptosis in cardiomyocytes, but proliferation and expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts. *FEBS Lett*. 1999;448:206-210.
 34. Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:2175-2183.
 35. van Eickels M, Vetter H, Grohe C. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition attenuates insulin-like growth factor-I (IGF-I) induced cardiac fibroblast proliferation. *Br J Pharmacol*. 2000;131:1592-1596.
 36. Mockridge JW, Benton EC, Andreeva LV, Latchman DS, Marber MS, Heads RJ. IGF-1 regulates cardiac fibroblast apoptosis induced by osmotic stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;273:322-327.
 37. Mujumdar VS, Tyagi SC. Temporal regulation of extracellular matrix components in transition from compensatory hypertrophy to decompensatory heart failure. *J Hypertens*. 1999;17:261-270.
 38. Tummalapalli CM, Heath BJ, Tyagi SC. Tissue inhibitor of metalloproteinase-4 instigates apoptosis in transformed cardiac fibroblasts. *J Cell Biochem*. 2001;80:512-521.
 39. Marshall BC, Santana A, Xu QP, Petersen MJ, Campbell EJ, Hoidal JR, Welgus HG. Metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in mesothelial cells. Cellular differentiation influences expression. *J Clin Invest*. 1993;91:1792-1799.
 40. Ou R, Sun Y, Ganjam VK, Weber KT. In situ production of angiotensin

- II by fibrosed rat pericardium. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28:1319-1327.
41. Sun Y, Weber KT. Angiotensin converting enzyme and myofibroblasts during tissue repair in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28:851-858.
 42. Sun Y, Weber KT. Cells expressing angiotensin II receptors in fibrous tissue of rat heart. *Cardiovasc Res.* 1996;31:518-525.
 43. Loging JA, New RB, Baicu SC, King MK, Hendrick JW, Crawford FA, Jr., de Gasparo M, Spinale FG. Effects of angiotensin type-I receptor blockade on pericardial fibrosis. *J Surg Res.* 1999;87:101-107.

2.7. FIGURE LEGENDS, TABLE AND FIGURES

Figure 1: Changes in the total number of cardiomyocyte nuclei (□) and non-cardiomyocyte nuclei (■) in the **A.** left ventricle and **B.** right ventricle of SHR treated for 4 weeks with valsartan or enalapril or age-matched untreated WKY rats. Changes in the total number of **C.** capillaries per cross-section (capillary density) **D.** capillary per myocyte, in the left ventricle of SHR treated for 4 weeks with valsartan or enalapril * Significantly different ($P < 0.003$) from SHR control group.

Figure 2: **A.** Increased DEVDase activity in homogenates of SHR ventricles isolated at 1 week of valsartan treatment or 2 weeks of enalapril treatment (■) as compared to controls (▨). * Significantly different ($P < 0.001$) from control group ($n=6/\text{group}$). **B.** Changes of apoptosis regulatory protein expression immunoblotted and probed with anti-Bax or anti-Bcl-2 antibody. Inset show representative band corresponding to the molecular mass of Bax (23 kDa) and Bcl-2 (26 kDa). The graph represents the Bax/Bcl-2 protein expression plotted for tissue lysates obtained from SHR treated for 1 week with valsartan and 2 weeks with enalapril (■). Data is presented as percentage of respective controls (▨). *Significantly different ($P < 0.05$) from control group ($n=6/\text{group}$).

Figure 3: Photomicrographs showing **A.** areas immunoreactive for α -sarcomeric actin (cardiomyocyte cell body in diffuse red) and areas positive for the total nuclear stain propidium iodide (bright red, sharply delineated spots). The arrow points a non-cardiomyocyte nucleus (located outside the α -sarcomeric actin stained area) (X600). **B.** The same field visualized under an FITC filter showing the same nucleus as a TUNEL-positive (bright green, sharply delineated) nucleus (X600). **C.** Endothelial cells (bright red, sharply

delineated spots) after staining with TRITC-labeled lectin (X600). **D.** In the same field, visualized under a DAPI filter, the arrow points a TUNEL-positive (bright blue, sharply delineated), lectin-negative non-cardiomyocyte nuclei, indicating an interstitial fibroblast (X600). **E.** TUNEL-positive nuclei prevalent in the epicardium (X400).

Figure 4: Effects of treatment with valsartan for 1 week and enalapril for 2 weeks on the percentage of TUNEL-positive staining versus respective controls in **A.** fibroblasts, **B.** endothelial cells, **C.** cardiomyocytes of SHR per cross-section of left and right ventricles. Data were analyzed using the nonparametric Mann-Whitney test. * Significantly different ($P < 0.05$) from control group ($n=6/\text{group}$).

Table 1: Ventricular morphology of SHR treated with valsartan or enalapril for 4 weeks or age-matched untreated WKY rats.

	WKY	SHR	SHR	SHR
		Control	Valsartan	Enalapril
Left ventricle				
Tissue cross-sectional area (mm ²)	47 ± 3 *	60 ± 1	54 ± 1 *	47 ± 1 *
Chamber cross-sectional area (mm ²)	15 ± 2	21 ± 1	20 ± 1	21 ± 1
Relative collagen content (%)	15.5 ± 0.4	15.2 ± 0.5	16.1 ± 0.2	14.4 ± 0.4
Cardiomyocyte cross-sectional area (µm ²)	182 ± 13 *	240 ± 11	177 ± 4 *	169 ± 6 *
Right ventricle				
Tissue cross-sectional area (mm ²)	9.3 ± 1.3	7.5 ± 0.5	7.1 ± 0.2	7.8 ± 0.7
Chamber cross-sectional area (mm ²)	5.7 ± 0.6	5.4 ± 0.4	6.4 ± 0.5	5.8 ± 0.4
Relative collagen content (%)	15.9 ± 0.3 *	14.4 ± 0.2	14.1 ± 0.3	14.0 ± 0.5

Equatorial sections of diastole-arrested, paraformaldehyde-fixed hearts were studied.

* Significantly different (P<0.05) from SHR control group. (n=6/group)

FIGURE 1

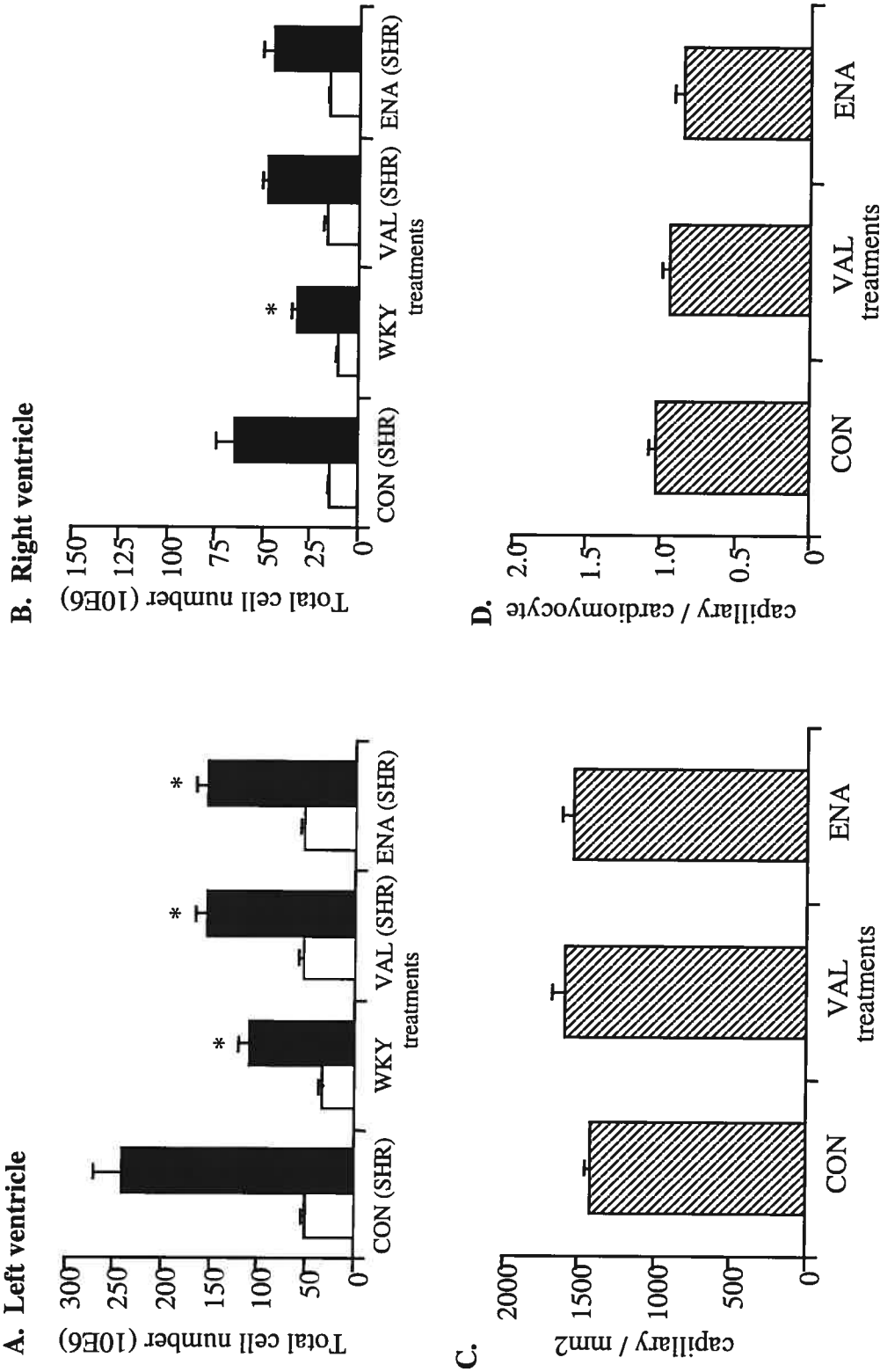
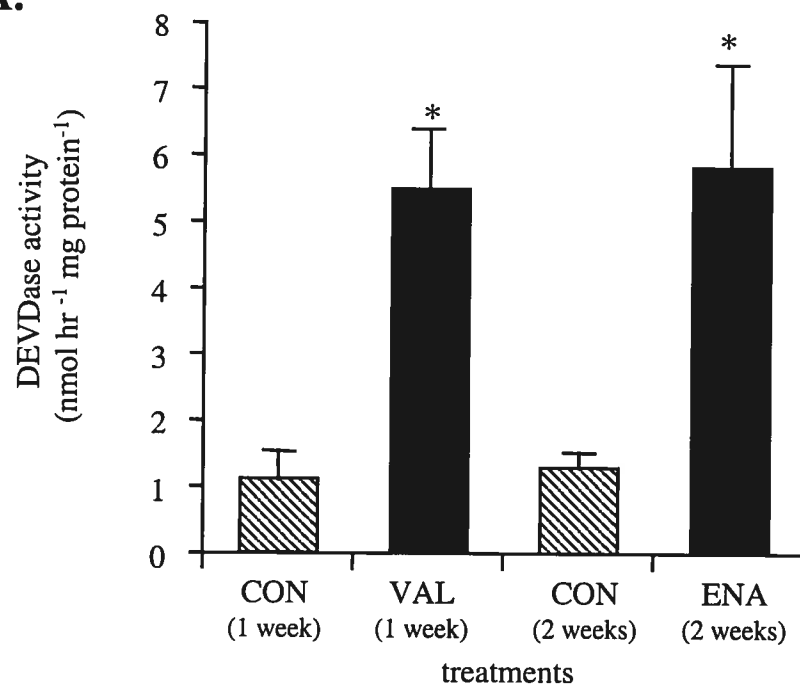


FIGURE 2

A.



B.

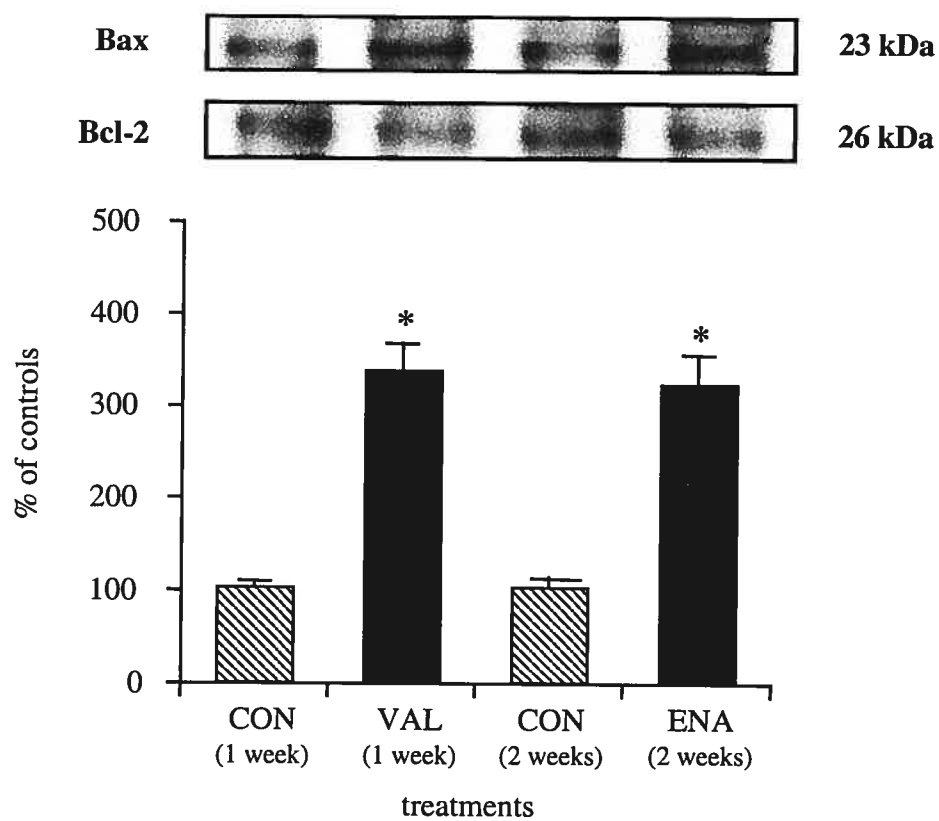


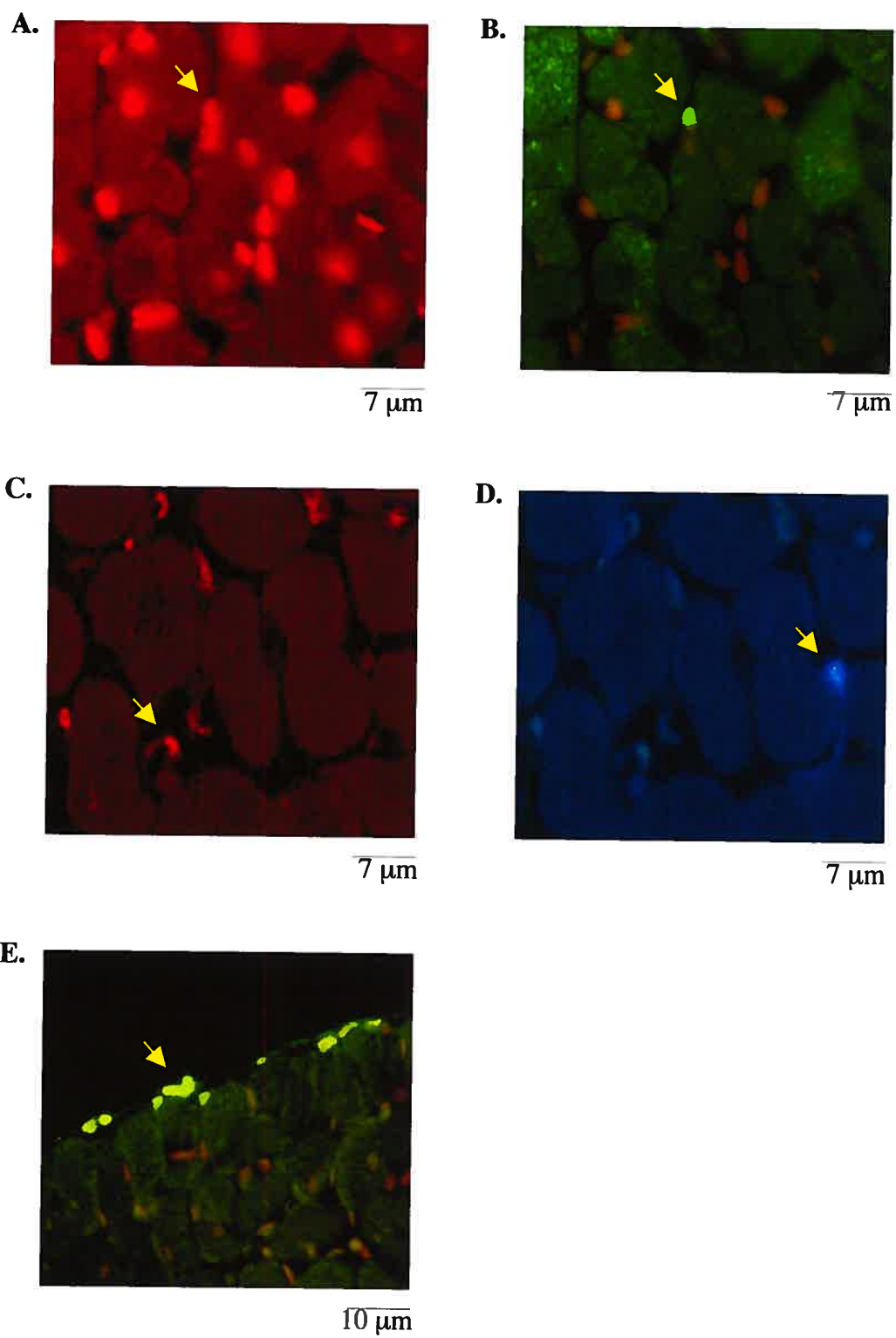
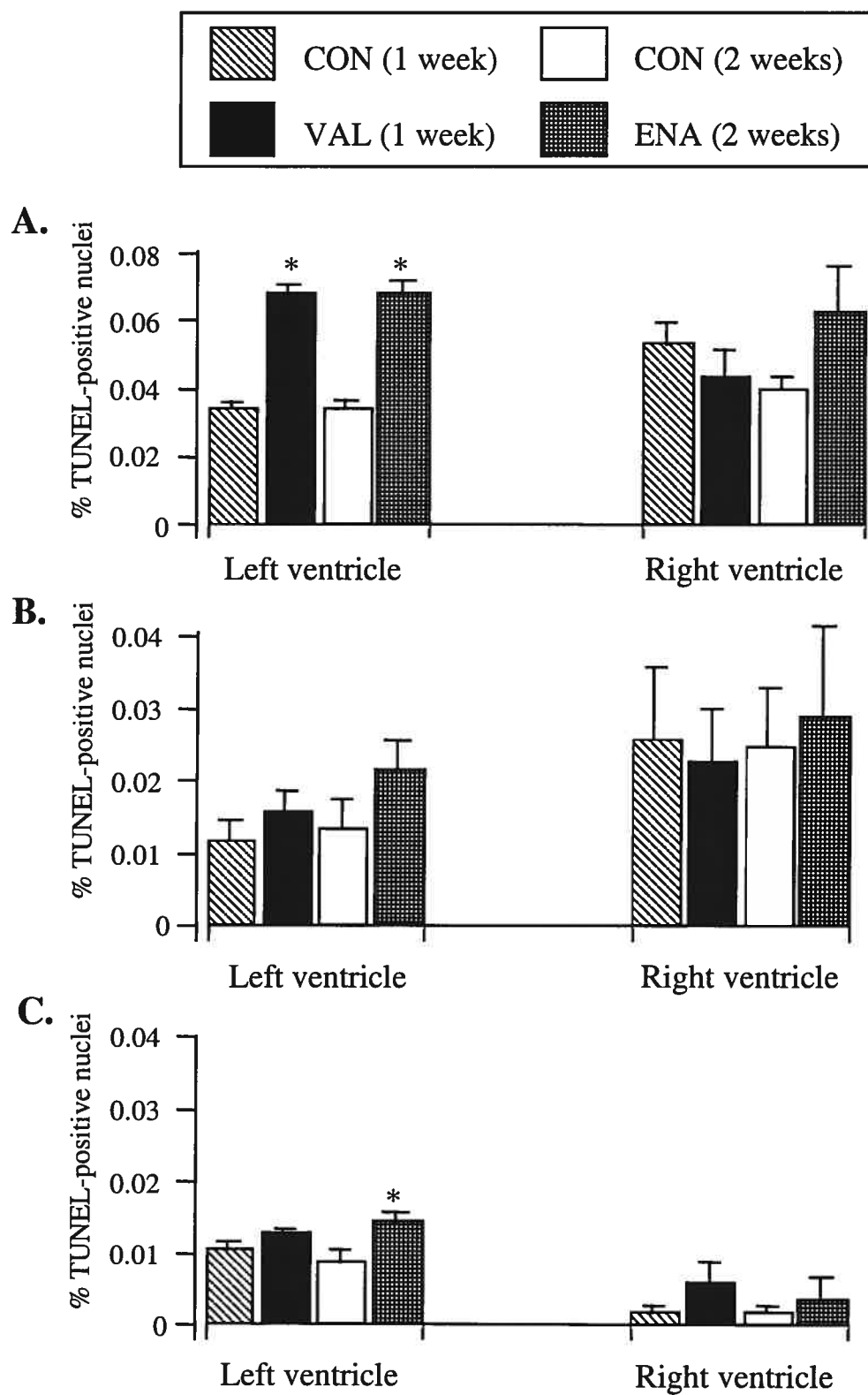
FIGURE 3

FIGURE 4



CHAPITRE 3

ROLE OF ANGIOTENSIN II TYPE 2 RECEPTORS DURING REGRESSION OF CARDIAC HYPERTROPHY IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

Shant Der Sarkissian, Bun-Seng Tea, Eve-Lyne Marchand,
Rhian M. Touyz, Denis deBlois¹

Short title: Der Sarkissian et al – AT₂R mediate cell type-specific apoptosis
in vivo

From the University of Montreal Hospital (CHUM) Research Center
(S.D.S., B.-S. T., E.L.M., D.D.)

3840 St. Urbain St., room 7-132B, Montreal, Quebec H2W 1T8, Canada

and The Clinical Research Institute of Montreal

(R.M.T.) 110 rue Des Pins Ouest, Montreal H2W 1R7, Canada

¹Tel.: (514) 890-8000 ext. 12919, Fax: (514) 412-7152, email:

[REDACTED]

¹Author for correspondence

Word count: 5,026

3.1. ABSTRACT

We previously reported that the selective AT₁ receptor antagonist valsartan and ACE inhibitor enalapril decrease DNA synthesis and stimulate apoptosis in interstitial fibroblasts and epicardial mesothelial cells during the regression of ventricular hypertrophy in the SHR. However, apoptosis peaks at 1 week of treatment with valsartan and later at 2 weeks with an equipotent antihypertensive dose of enalapril. To examine the role of the AT₂ receptor in this model, SHR were treated with valsartan or enalapril, alone or in combination with the selective AT₂ antagonist PD123319 for 1-2 weeks. Apoptosis was evaluated by the quantification of internucleosomal fragmentation in extracted DNA, or *in situ* by TUNEL immunohistology. At 1 week, valsartan significantly increased DNA fragmentation (2-fold) in ventricular homogenates, increased epicardial cell apoptosis (1.9-fold), and decreased DNA synthesis (16%). At 2 weeks, DNA content, total interstitial non-cardiomyocyte hyperplasia and cardiomyocyte cross-sectional area were reduced by 34%, 27% and 25% respectively. These valsartan-induced changes were attenuated by PD123319 co-administration. Immunohistological analysis revealed a selective (4.7-fold) increase in interstitial fibroblast apoptosis only in the left ventricle of rats treated with valsartan for 1 week. This was unaffected by the AT₂ blocker. PD123319 administered alone had no effect on the parameters under study. In parallel, enalapril-induced ventricular changes were similar to those observed with valsartan but were not affected by co-treatment with PD123319. Together, these results demonstrate that AT₁ and AT₂ receptors act in a coordinated and cell-specific manner to regulate cell growth and apoptosis in the heart of SHR during AT₁ receptor blockade but not converting enzyme inhibition.

Keywords: apoptosis, angiotensin II receptors, DNA synthesis, hypertrophy, hypertension.

3.2. INTRODUCTION

Angiotensin II (Ang II) is the major effector of the renin-angiotensin system and represents a key regulator of cardiovascular homeostasis. Two main subtypes of Ang II receptors have been cloned and pharmacologically defined; namely AT₁ receptors which are blocked specifically by antagonists such as valsartan, and AT₂ receptors which are blocked specifically by PD123319.¹ Depending on the subtype of receptor on which it binds, Ang II can exert opposite effects. AT₁ receptors mediate most of the known actions of Ang II such as pressor, mitogenic, hypertrophic and proinflammatory effects, whereas AT₂ receptors exert antiproliferative and apoptotic effects offsetting and counteracting AT₁ receptor functions.²⁻⁵ Moreover, relative percentages of Ang II receptor subtypes vary depending on tissue, cell type, developmental status and pathology,⁶ such as cardiac hypertrophy where AT₂ receptor expression is increased relative to AT₁ receptors.⁷ This in turn may be important in determining cardiac function, structure and therapeutic interventions. AT₂ receptors suppress cell growth and induce apoptosis *in vitro*.^{4,5,8} Yet, the role of AT₂ receptors in cardiac disorders and response to therapy remains controversial. Studies in AT₂ receptor transgenic mice report a cardioprotective effect of AT₂ receptors against fibrosis following Ang II infusion.⁹ In cultured rat neonatal cardiomyocytes, AT₂ receptor activation attenuates the stimulation of protein synthesis induced by Ang II stimulation of AT₁ receptors.¹⁰ In contrast, deletion of the AT₂ receptor gene prevents the development of cardiac hypertrophy in mice subjected to aortic coarctation or AngII infusion.^{11,12} Finally, survival after myocardial infarction is reportedly increased¹³ or decreased¹⁴ in AT₂ receptor knockout mice. These inconsistencies between the different experimental models suggest that the role of AT₂ receptors in modulating cardiac remodeling may be context dependent, as recently reviewed.¹⁵

The SHR is a model of genetically-determined hypertension showing cardiac hyperplasia early in life¹⁶⁻¹⁸ mainly in fibroblasts^{19,20}. Treatment with losartan or

enalapril reverses left ventricular hyperplasia in SHR via a selective and transient induction of apoptosis in interstitial fibroblasts and epicardial cells²⁰, an effect that is accompanied by a sustained inhibition of cardiac DNA synthesis.²¹ We previously reported that cardiac apoptosis occurs significantly earlier with equipotent antihypertensive doses of AT₁ antagonists (at 1 week) than ACE inhibitors (at 2 weeks), suggesting distinct mechanisms of action.^{20,21} Considering that AT₁ receptor antagonists cause a rise in circulating Ang II levels which would then be free to act on unblocked AT₂ receptors,^{22,23} we proposed that Ang II action via AT₂ receptors may be involved in apoptosis stimulation in response to AT₁ receptor blockade but not ACE inhibition. Consistent with this, co-administration of the AT₂ receptor antagonist PD123319 prevents apoptosis induction, growth suppression and vascular hypertrophy regression in the aorta of SHR treated with valsartan without affecting enalapril-induced apoptosis.²⁴ In order to examine the role of AT₂ receptors in cardiac remodeling during AT₁ receptor blockade, the hearts of SHR from this later study²⁴ were examined in the present study. We now report that AT₁ receptor inhibition and AT₂ receptor activation play a coordinate and cell-specific role in regulating cell fate during regression of cardiac hypertrophy induced by AT₁ antagonism.

3.3. METHODS

Animal procedures

The ten week-old male SHR in this study are the same animals used in our previous study investigating aortic responses to angiotensin pathway blockers.²⁴ Briefly, rats (n=5-8/group) were treated for 1-2 weeks with the selective AT₁ antagonist valsartan (30 mg/kg/day p.o.; gift of Novartis, Toronto, ON), the selective AT₂ antagonist PD123319 (30 mg/kg/day s.c.; gift of Parke-Davis, Ann Arbor, MI) or a combination of both drugs. A subgroup of rats received enalapril (30 mg/kg/day p.o., Sigma Chemicals, St-Louis, MO) in combination or not with

PD123319 for 2 weeks. Controls received vehicle. All animal manipulations were conducted according to institutional guidelines.

Hearts were excised, both ventricles were isolated together, weighed and an equatorial cross-section (3 mm) was fixed overnight in 4% paraformaldehyde and later paraffin-embedded for *in situ* apoptosis detection as well as for hypertrophy and hyperplasia measurements. The remaining tissue was prepared for DNA synthesis (*in vivo* [^3H]-thymidine incorporation into DNA during the last 2 hours before sacrifice) and oligonucleosomal DNA fragmentation (indicative of apoptosis)²⁵ as well as cardiac AT₁ and AT₂ receptor gene quantifications as described previously²⁴.

Analysis of apoptosis

Our previous time course studies showed that DNA fragmentation indicative of apoptosis is maximally increased in the SHR heart after 1 week of AT₁ antagonist treatment and 2 weeks of ACE inhibitor treatment during regression of hypertrophy.^{20,21} Thus, these time points for valsartan (1 week) and enalapril (2 weeks) were selected for study of the role of AT₂ receptors in apoptosis.

To assess the cell type undergoing apoptosis, we proceeded with an *in situ* fluorescent labeling protocol as we described previously.²⁰ Briefly, tdt-mediated dUTP-FITC or AMCA nick end labeling (TUNEL) of nuclei was used as a marker of apoptosis, in conjunction with TRITC α -sarcomeric actin immunoreactivity and propidium iodide staining as markers for cardiomyocytes and total cardiac nuclei respectively, or TRITC lectin reactivity as a marker for endothelial cells. Figure 1 shows representative photomicrographs of TUNEL and immunohistological staining. Image analysis of fluorochrome-labeled cells was performed in a blinded manner in fluorescence microscopy using appropriate filters. Quantification was conducted separately in the right and left ventricles of the myocardium. All TUNEL-positive cell type-specific nuclei (cardiomyocyte, non-cardiomyocyte: endothelial and fibroblast) in each section were counted and results were expressed as the percentage of TUNEL-positive cell type-specific

nuclei per cross-section as we described previously.²⁰

Hypertrophy and hyperplasia measurements

Using the NIH Image program, 50 random measurements of transversely oriented cardiomyocyte cross-sectional areas were collected in order to establish hypertrophy values. Moreover, the total number of cardiomyocyte within each ventricle of SHR from the 2 week valsartan study was assessed stereologically as per Anversa et al.²⁶ A similar procedure was used to calculate total non-cardiomyocytes as we described previously.²⁰

Statistical analysis

Values are presented as mean \pm SEM. Data from treated groups were compared with those of control group by analysis of variance (ANOVA) and unpaired Student's t-test with Bonferroni/Dunn correction for multiple comparisons. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3.4 RESULTS

As we have described previously in a study conducted on aortas from the same SHR used in this study, valsartan and enalapril significantly reduced high blood pressure within 2 weeks of treatment and this was not prevented by AT₂ receptor antagonist PD123319 co-administration.²⁴ In these animals, Ang II plasma levels are increased with valsartan (6-fold) and markedly reduced with enalapril (>80%) after 2-weeks of treatment.²⁴

In this study, expression of both AT₁ and AT₂ receptor mRNA was evident in cardiac specimens from control and treated SHR (Figure 2A, 2B). In control rats, the expression of AT₁ receptors is 2.3-times greater than that of the AT₂ subtype. As compared to controls, valsartan- treated animals displayed a significant 3.4-fold downregulation in AT₁ receptor expression. PD123319 had no significant

effect on cardiac AT₁ or AT₂ receptor expression.

Study with valsartan

Valsartan caused a 2-fold transient increase in internucleosomal DNA fragmentation at 1 week only (Figure 3A) followed by a 34% decrease in DNA content versus control values (2.7 ± 0.2 $\mu\text{g}/\text{heart/g}$ body weight) at 2 weeks. Valsartan decreased DNA synthesis by 16% at 1 week and by 20% at 2 weeks (Figure 3B). At that time, valsartan decreased cardiomyocyte cross-sectional area by 25% versus control values (Figure 4A). After 2 weeks of treatment, valsartan selectively decreased by 27% ($P < 0.013$) the total number of non-cardiomyocytes essentially interstitial fibroblast²⁰ in the left ventricle suggesting regression of hyperplasia (Figure 5A). The right ventricle showed no significant change in cellularity with therapy (Figure 5B). At 2 weeks, capillary density (capillary/ mm^2) and capillaries per myocyte in the myocardium remained unchanged by treatments (versus respective controls: 1127 ± 42 and 1.32 ± 0.03 , Figure 5C, 5D). Co-administration of PD123319, however, prevented the effects of valsartan on ventricular DNA fragmentation, DNA synthesis (Figures 3A, 3B), DNA content, cardiomyocyte cross-sectional area (Figure 4A) and fibroblast hyperplasia (Figure 5A).

To determine the distribution and the cell type undergoing apoptosis within the heart, DNA fragments with free 3'OH ends were labeled *in situ* in ventricular cross-sections using immunofluorescent staining technique as we previously described.²⁰ At 1 week, valsartan treatment caused a significant 4.7-fold increase in TUNEL staining selectively in interstitial fibroblasts of the left ventricle only (Figure 6A), but not in endothelial cells and cardiomyocytes (Figure 6B and 6C, respectively). This effect was predominantly localized in the sub-epicardial area (data not shown) and was not affected by co-treatment with PD123319. Treatments did not modulate TUNEL staining in the right ventricle. As previously reported,²⁰ epicardial non-cardiomyocytes showed by far the greatest frequency of

TUNEL positive nuclei. In this region, valsartan increased apoptosis by 1.9-fold versus controls (Figure 7). In contrast to fibroblasts, valsartan-induced epicardial apoptosis was completely abolished by the co-administration of PD123319. PD123319 administered alone did not affect any of the parameters studied. Overall, the absolute numbers of TUNEL-positive nuclei per cardiac cross-section was in the range of 2 to 11 nuclei in the fibroblast population and 23 to 135 nuclei in the mesothelial cell population.

Study with enalapril

Enalapril decreased DNA synthesis by 14% at 2 weeks, a response that was not affected by co-administration with PD123319 (Figure 3D). DNA content was also reduced in the enalapril group and the PD123319 co-treatment group (2.9 ± 0.2 and 2.8 ± 0.2 $\mu\text{g}/\text{heart}/\text{g}$ body weight, respectively) versus controls (4.1 ± 0.3 $\mu\text{g}/\text{heart}/\text{g}$ body weight). Cardiomyocyte cross-sectional area control values were not affected by enalapril given alone or with PD123319 (Figure 4B). Stereological quantifications of total cardiac nuclei were omitted in the enalapril study since we have previously observed that the resorption of non-cardiomyocyte hyperplasia is temporarily dissociated from the early time window of apoptosis and it is observed later at 4 weeks of treatment.²⁰

Enalapril caused a 2.4-fold increase in internucleosomal DNA fragmentation at 2 weeks which was not prevented by co-administration of PD123319 (Figure 3C). As we previously reported,²⁰ enalapril caused a significant increase in TUNEL staining selectively in interstitial fibroblasts of the left ventricle only but not in endothelial cells or cardiomyocytes. Basal levels of apoptosis were highest in the epicardial region and further increased by enalapril treatment. However, co-treatment with PD123319 did not affect these enalapril-induced changes (data not shown).

3.5. DISCUSSION

There is mounting evidence that Ang II modulation of cell growth and apoptosis is cell type-dependent. Whereas AT₁ receptors increase hypertrophy and apoptosis in cardiomyocytes, AT₁ receptors enhance proliferation in fibroblasts.^{15,27,28} Normal and postinfarcted hypertrophied rat cardiomyocytes stimulated with Ang II show increased apoptosis through AT₁ receptor activation.²⁹ Cardiomyocytes isolated from SHR at 30 weeks of age show AT₁ and AT₂ receptor-mediated apoptosis in response to Ang II *in vitro*.³⁰ In contrast, AngII-induced apoptosis is exclusively AT₁-mediated in cardiomyocytes isolated from age-matched normotensive Wistar-Kyoto rats.³⁰ Although cardiomyocytes account for the bulk of cardiac cellular mass, the majority of cells present in the heart are non-cardiomyocytes, including vascular and epicardial cells and a large predominance of fibroblasts^{20,26,28}. The levels of expression of AT₁ and AT₂ receptors may also determine the cardiac response to AT₁ receptor antagonist. The AT₁ receptor by far is the predominant Ang II receptor subtype expressed in the normal adult heart but cardiac expression of AT₂ receptors increases with hypertrophy and progression to failure¹⁵. Fibroblasts appear to be a main site of AT₂ receptor expression^{27,31,32}, although functional AT₂ receptors are also found on cardiomyocytes^{30,33} and endothelial cells^{3,34,35}. The present data on AngII receptor expression are consistent with a previous study in which administration of losartan or PD123319 in SHR between 10 and 20 weeks of age resulted in reduced AT₁ and AT₂ receptor mRNA expression.³⁶

The main finding of the present study is that AT₁ and AT₂ receptors contributed to valsartan-induced cardiac remodeling by regulating apoptosis in a cell-specific manner in young adult SHR. Co-treatment with PD123319 attenuated the increase in internucleosomal DNA fragmentation, indicative of apoptosis induction, and fibroblast deletion during the regression of cardiac hypertrophy in SHR treated with valsartan. Histological analysis revealed, however, that apoptosis was

differentially regulated depending on the cell type examined. Whereas valsartan selectively increased TUNEL labeling in interstitial fibroblasts and epicardial mesothelial cells, PD123319 reduced TUNEL labeling only in epicardial mesothelial cells. These results implicate AT₂ receptors in mediating mesothelial cell but not fibroblast apoptosis. This is in apparent contrast with the observation that valsartan-induced reduction in fibroblast number was attenuated by PD123319. A possible explanation is that the dynamics of cardiac fibroblast population is determined by the balance between cell proliferation and cell death, a feature we have recently documented¹⁸. Consistent with this view, valsartan-induced inhibition of cardiac DNA synthesis was attenuated by PD123319 co-administration. Inasmuch as fibroblasts contribute to cardiac DNA synthesis, these results suggest that PD123319 attenuated or retarded the reduction in fibroblast number by preventing growth inhibition in the presence of valsartan. Moreover, since the absolute cell number obtained by stereological quantification in the heart represents a balance between the cumulative effect of ongoing cellular proliferation and death (apoptosis, necrosis), TUNEL results obtained for a single cell type can hardly be associated with absolute cell number variations, but should be considered as a contributing factor. Compared to the high level of epicardial apoptosis in SHR treated with valsartan or enalapril, the levels of apoptosis in interstitial fibroblasts observed in the present study is low but nevertheless physiologically important. We recently documented that it results in significant reversal of fibroblast hyperplasia after 4 week-treatment in SHR.²⁰ We proposed that fibroblast apoptosis may contribute to the reversal of cardiac interstitial fibrosis observed with angiotensin receptor blockers.

Several studies suggest that apoptosis increases in cardiomyocytes following AT₁ receptor activation *in vitro*^{29,30,37} or with ageing *in vivo*^{38,39}, a feature that is reduced with inhibitors of the renin-angiotensin system.³⁸⁻⁴⁰ In the present study with young adult SHR, valsartan did not modulate the low levels of apoptosis in cardiomyocyte but decreased their hypertrophy, an effect that was reversed by the

co-administration of PD123319 independently of blood pressure changes. These results are consistent with the observations of Booz et al¹⁰ showing the countervailing influence of AT₂ receptors on AT₁-mediated protein synthesis and cellular hypertrophy in rat neonatal cardiomyocytes.

This study provides the first evidence that AT₂ receptors mediate apoptosis in mesothelial cells but not fibroblasts during the initial phase of hypertrophy regression in the heart of SHR after AT₁ receptor antagonism *in vivo*, suggesting different susceptibilities of cardiac cell types in undergoing apoptosis. In the epicardium, valsartan but not enalapril-stimulated apoptosis was completely blocked by the co-administration of PD123319, suggesting a role for AT₂ receptors as a negative determinant of mesothelial cell survival. Increased apoptosis in the mesothelial cell layer during regression of hypertrophy is likely to be an adaptative response to the regression of ventricular mass. Mesothelial cells are an important source of mediators implicated in cardiac damage including endothelin⁴¹ and angiotensin-converting enzyme⁴². Whether AT₂ knockout mice show functional or structural alterations specific to the epicardium is unknown but the possibility that developmental alterations in epicardial phenotype in AT₂ knockout mice may contribute to the discrepant results with these models is intriguing. Finally, the present data suggest the prevention of post-operative epicardial adhesions in pigs treated with valsartan may involve AT₂ receptor-mediated mesothelial cell apoptosis⁴³. It was recently shown that AT₂ receptors stimulate kininogenase activity with subsequent activation of kinin B₂ receptors and nitric oxide production^{44,45}. Thus, we cannot rule out the possibility that AT₁ antagonists and converting enzyme inhibitors regulate mesothelial cell apoptosis via this common pathway.

Administration of PD123319 alone had no significant effect suggesting that AT₂ receptors do not elicit a tonic pro-apoptotic and anti-growth effect under basal conditions in the heart of SHR. This is a feature which we have observed

previously in SHR aorta²⁴ and which is consistent with the observations of Makino et al.³⁶ Increased Ang II generation in SHR treated with valsartan, as we previously documented²⁴, may be involved in mediating AT₂-dependent apoptosis in the epicardium. Alternatively, a balance of countervailing influences between AT₁ and AT₂ receptors may be involved.

It has been reported that AT₂ receptors blunt AT₁-induced proliferation in coronary endothelial cells isolated from SHR hearts.³ We now report that administration of angiotensin receptor antagonists alone or in combination did not affect endothelial cell apoptosis or decrease capillary number or density within 2 weeks of treatment. These data are consistent with previous reports demonstrating that cardiac capillaries are not decreased in SHR receiving renin-angiotensin system inhibitors.^{46,47} However, potential long-term effects of therapy on endothelial cell population dynamics cannot be excluded.

Perspectives

Our *in vivo* results provide a conceptual framework for novel therapeutic intervention in cardiac hypertrophy management. Considering that AT₂ receptors may be up-regulated in cardiac pathologies^{7,10,48}, further studies should investigate angiotensin receptor subtypes as cell type-specific determinants which could represent selective targets for disease intervention.

Acknowledgements

This work was supported in part by a grant from the Canadian Institute of Health Research (CIHR; MOP-4252). DD is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. SDS and ELM both hold a studentship from the Heart and Stroke Foundation of Canada in partnership with the Canadian Institutes for Health Research.

3.6. REFERENCES

1. Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev.* 1993;45:205-51.
2. Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:10663-7.
3. Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation.* 1995;95:651-657.
4. Yamada T, Horiuchi M, Dzau VJ. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:156-60.
5. Horiuchi M, Yamada T, Hayashida W, Dzau VJ. Interferon regulatory factor-1 up-regulates angiotensin II type 2 receptor and induces apoptosis. *J Biol Chem.* 1997;272:11952-8.
6. Viswanathan M, Tsutsumi K, Correa FMA, Saavedra JM. Changes in expression of angiotensin receptor subtypes in the rat aorta during development. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1991;179:1361-1367.
7. Lopez JJ, Lorell BH, Ingelfinger JR, Weinberg EO, Schunkert H, Diamant D, Tang SS. Distribution and function of cardiac angiotensin AT1- and AT2-receptor subtypes in hypertrophied rat hearts. *Am J Physiol.* 1994;267:H844-52.
8. Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension.* 1999;33:613-21.

9. Kurisu S, Ozono R, Oshima T, Kambe M, Ishida T, Sugino H, Matsuura H, Chayama K, Teranishi Y, Iba O, Amano K, Matsubara H. Cardiac angiotensin II type 2 receptor activates the kinin/NO system and inhibits fibrosis. *Hypertension*. 2003;41:99-107.
10. Booz GW, Baker KM. Role of type 1 and type 2 angiotensin receptors in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension*. 1996;28:635-40.
11. Ichihara S, Senbonmatsu T, Price E, Jr., Ichiki T, Gaffney FA, Inagami T. Angiotensin II type 2 receptor is essential for left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis in chronic angiotensin II-induced hypertension. *Circulation*. 2001;104:346-51.
12. Senbonmatsu T, Ichihara S, Price E, Jr., Gaffney FA, Inagami T. Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during in vivo pressure overload. *J Clin Invest*. 2000;106:R25-9.
13. Oishi Y, Ozono R, Yano Y, Teranishi Y, Akishita M, Horiuchi M, Oshima T, Kambe M. Cardioprotective role of AT2 receptor in postinfarction left ventricular remodeling. *Hypertension*. 2003;41:814-8.
14. Adachi Y, Saito Y, Kishimoto I, Harada M, Kuwahara K, Takahashi N, Kawakami R, Nakanishi M, Nakagawa Y, Tanimoto K, Saitoh Y, Yasuno S, Usami S, Iwai M, Horiuchi M, Nakao K. Angiotensin II type 2 receptor deficiency exacerbates heart failure and reduces survival after acute myocardial infarction in mice. *Circulation*. 2003;107:2406-8.
15. Opie LH, Sack MN. Enhanced angiotensin II activity in heart failure: reevaluation of the counterregulatory hypothesis of receptor subtypes. *Circ Res*. 2001;88:654-8.
16. Walter SV, Hamet P. Enhanced DNA synthesis in heart and kidney of newborn spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1986;8:520-525.
17. Hamet P, Richard L, Dam T-V, Teiger E, Orlov SN, Gaboury L, Gossard F, Tremblay J. Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension*. 1995;26:642-648.

18. Thorin-Trescases N, deBlois D, Hamet P. Evidence of an altered in vivo vascular cell turnover in spontaneously hypertensive rats and its modulation by long-term antihypertensive treatment. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001;38:764-74.
19. Liu JJ, Peng L, Bradley CJ, Zulli A, Shen J, Buxton BF. Increased apoptosis in the heart of genetic hypertension, associated with increased fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 2000;45:729-35.
20. Der Sarkissian S, Marchand EL, Duguay D, Hamet P, deBlois D. Reversal of interstitial fibroblast hyperplasia via apoptosis in hypertensive rat heart with valsartan or enalapril. *Cardiovasc Res.* 2003;57:775-83.
21. Tea BS, Dam TV, Moreau P, Hamet P, deBlois D. Apoptosis during regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats : temporal regulation and spatial heterogeneity [In Process Citation]. *Hypertension.* 1999;34:229-35.
22. Bernstein KE, Alexander RW. Counterpoint: molecular analysis of the angiotensin II receptor. *Endocr Rev.* 1992;13:381-6.
23. Brunner HR, Christen Y, Munafo A, Lee RJ, Waeber B, Nussberger J. Clinical experience with angiotensin II receptor antagonists. *Am J Hypertens.* 1992;5:243S-246S.
24. Tea BS, Der Sarkissian S, Touyz RM, Hamet P, deBlois D. Proapoptotic and Growth-Inhibitory Role of Angiotensin II Type 2 Receptor in Vascular Smooth Muscle Cells of Spontaneously Hypertensive Rats In Vivo. *Hypertension.* 2000;35:1069-1073.
25. deBlois D, Tea BS, Than VD, Tremblay J, Hamet P. Smooth muscle apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1997;29:340-9.
26. Anversa P, Zhang X, Li P, Capasso JM. Chronic coronary artery constriction leads to moderate myocyte loss and left ventricular dysfunction and failure in rats. *J Clin Invest.* 1992;89:618-29.

27. Ohkubo N, Matsubara H, Nozawa Y, Mori Y, Murasawa S, Kijima K, Maruyama K, Masaki H, Tsutumi Y, Shibasaki Y, Iwasaka T, Inada M. Angiotensin type 2 receptors are reexpressed by cardiac fibroblasts from failing myopathic hamster hearts and inhibit cell growth and fibrillar collagen metabolism. *Circulation*. 1997;96:3954-62.
28. Weber KT. Cardioreparation in hypertensive heart disease. *Hypertension*. 2001;38:588-91.
29. Leri A, Liu Y, Li B, Fiordaliso F, Malhotra A, Latini R, Kajstura J, Anversa P. Up-regulation of AT(1) and AT(2) receptors in postinfarcted hypertrophied myocytes and stretch-mediated apoptotic cell death. *Am J Pathol*. 2000;156:1663-72.
30. Ravassa S, Fortuno MA, Gonzalez A, Lopez B, Zalba G, Fortuno A, Diez J. Mechanisms of increased susceptibility to angiotensin II-induced apoptosis in ventricular cardiomyocytes of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2000;36:1065-71.
31. Wharton J, Morgan K, Rutherford RA, Catravas JD, Chester A, Whitehead BF, De Leval MR, Yacoub MH, Polak JM. Differential distribution of angiotensin AT2 receptors in the normal and failing human heart. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;284:323-36.
32. Tsutsumi Y, Matsubara H, Ohkubo N, Mori Y, Nozawa Y, Murasawa S, Kijima K, Maruyama K, Masaki H, Moriguchi Y, Shibasaki Y, Kamihata H, Inada M, Iwasaka T. Angiotensin II type 2 receptor is upregulated in human heart with interstitial fibrosis, and cardiac fibroblasts are the major cell type for its expression. *Circ Res*. 1998;83:1035-46.
33. Jugdutt BI, Balghith M. Enhanced regional AT(2)-receptor and PKC(epsilon) expression during cardioprotection induced by AT(1)-receptor blockade after reperfused myocardial infarction. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2001;2:134-40.
34. Wolf G, Harendza S, Schroeder R, Wenzel U, Zahner G, Butzmann U, Freeman RS, Stahl RA. Angiotensin II's antiproliferative effects mediated

- through AT₂-receptors depend on down-regulation of SM-20. *Lab Invest.* 2002;82:1305-17.
35. Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells: Protective effect of nitric oxide. *Circ Res.* 1997;81:970-976.
 36. Makino N, Sugano M, Otsuka S, Hata T. Molecular mechanism of angiotensin II type I and type II receptors in cardiac hypertrophy of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1997;30:796-802.
 37. Leri A, Claudio PP, Li Q, Wang X, Reiss K, Wang S, Malhotra A, Kajstura J, Anversa P. Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the Bcl-2-to-Bax protein ratio in the cell. *J Clin Invest.* 1998;101:1326-42.
 38. Diez J, Panizo A, Hernandez M, Vega F, Sola I, Fortuno MA, Pardo J. Cardiomyocyte apoptosis and cardiac angiotensin-converting enzyme in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1997;30:1029-1034.
 39. Li Z, Bing OH, Long X, Robinson KG, Lakatta EG. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *American Journal of Physiology.* 1997;272:H2313-H2319.
 40. Fortuno MA, Ravassa S, Etayo JC, Diez J. Overexpression of Bax protein and enhanced apoptosis in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats: effects of AT₁ blockade with losartan. *Hypertension.* 1998;32:280-286.
 41. Kuwahara M. Pericardial mesothelial cells produce endothelin-1 and possess functional endothelin ETB receptors. *Eur J Pharmacol.* 1998;347:329-35.
 42. Ou R, Sun Y, Ganjam VK, Weber KT. In situ production of angiotensin II by fibrosed rat pericardium. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28:1319-27.

43. Loging JA, New RB, Baicu SC, King MK, Hendrick JW, Crawford FA, Jr., de Gasparo M, Spinale FG. Effects of angiotensin type-I receptor blockade on pericardial fibrosis. *J Surg Res.* 1999;87:101-7.
44. Tsutsumi Y, Matsubara H, Masaki H, Kurihara H, Murasawa S, Takai S, Miyazaki M, Nozawa Y, Ozono R, Nakagawa K, Miwa T, Kawada N, Mori Y, Shibasaki Y, Tanaka Y, Fujiyama S, Koyama Y, Fujiyama A, Takahashi H, Iwasaka T. Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *J Clin Invest.* 1999;104:925-35.
45. Gohlke P, Pees C, Unger T. AT2 receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. *Hypertension.* 1998;31:349-55.
46. Zhu YC, Zhu YZ, Gohlke P, Stauss HM, Unger T. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II AT1 receptor antagonism on cardiac parameters in left ventricular hypertrophy. [Review] [65 refs]. *American Journal of Cardiology.* 1997;80:110A-117A.
47. Gohlke P, Linz W, Scholkens B, Van Even P, Martorana P, Unger T. Vascular and cardiac protection by ramipril in spontaneously hypertensive rats: prevention versus regression study [published erratum appears in Br J Clin Pract Symp Suppl 1996 Sep;50(6):293]. *Br J Clin Pract Suppl.* 1996;84:1-10.
48. Chung O, Stoll M, Unger T. Physiologic and pharmacologic implications of AT1 versus AT2 receptors. *Blood Press Suppl.* 1996;2:47-52.

3.7. FIGURE LEGENDS AND FIGURES

Figure 1: Photomicrographs (X600) showing **A.** areas immunoreactive for α -sarcomeric actin (cardiomyocyte cell body in diffuse red) and areas positive for the total nuclear stain propidium iodide (bright red, sharply delineated spots). The arrow points a non-cardiomyocyte nucleus (located outside the α -sarcomeric actin stained area). **B.** The same field visualized under an FITC filter showing the same nucleus as a TUNEL-positive (bright green, sharply delineated) nucleus. **C.** Endothelial cells (bright red, sharply delineated spots) after staining with TRITC-labeled lectin. **D.** In the same field, visualized under an AMCA filter, the arrow points a TUNEL-positive (bright blue, sharply delineated), lectin-negative non-cardiomyocyte nuclei, indicating an interstitial fibroblast. **E.** TUNEL-positive nuclei prevalent in the epicardium.

Figure 2. Detection of AT₁ and AT₂ mRNAs by reverse transcription-polymerase chain reaction in the heart of treated SHR. GAPDH mRNA is internal control. Amount of AT₁ and AT₂ mRNA was measured by scanning and is expressed as ratio of optical density of AT receptor to GAPDH mRNA.

Figure 3. Changes in (**A.** and **C.**) internucleosomal DNA fragmentation and (**B.** and **D.**) DNA synthesis in the ventricle of SHR treated for 1 or 2 weeks with valsartan (VAL), PD123319 (PD), enalapril (ENA) or a combination of VAL or ENA with PD. * Significantly different ($P < 0.05$) from control group ($n=5-8$ per group).

Figure 4. Effects of treatment with valsartan (VAL), PD123319 (PD) or a combination of VAL and PD for 2 weeks on the cardiomyocyte cross-sectional area. * Significantly different ($P < 0.05$) from control group ($n=5$ per group).

Figure 5. Changes in the total number of cardiomyocyte nuclei (□) and non-cardiomyocyte nuclei (■) in the **A.** left ventricle and **B.** right ventricle of SHR treated for 2 weeks with valsartan (VAL), PD123319 (PD) or a combination of VAL and PD. Changes in the total number of **C.** capillaries per cross-section (capillary density) and **D.** capillary per myocyte, in the heart of SHR treated for 2 weeks with valsartan (VAL), PD123319 (PD) or a combination of VAL and PD * Significantly different ($P<0.05$) from control group ($n=5-8$ per group).

Figure 6. Effects of treatment with valsartan (VAL), PD123319 (PD) or a combination of VAL and PD for 1 week on the percentage of TUNEL-positive nuclei among the population of **A.** fibroblasts, **B.** endothelial cells, **C.** cardiomyocytes per cross-section of the left ventricles of SHR. * Significantly different ($P<0.05$) from control group ($n=5-8$ per group).

Figure 7. Effects of treatment **A.** with valsartan (VAL), PD123319 (PD) or a combination of VAL and PD for 1 week on the percentage of TUNEL-positive nuclei among epicardial mesothelial cells * Significantly different ($P<0.05$) from control group ($n=5-8$ per group).

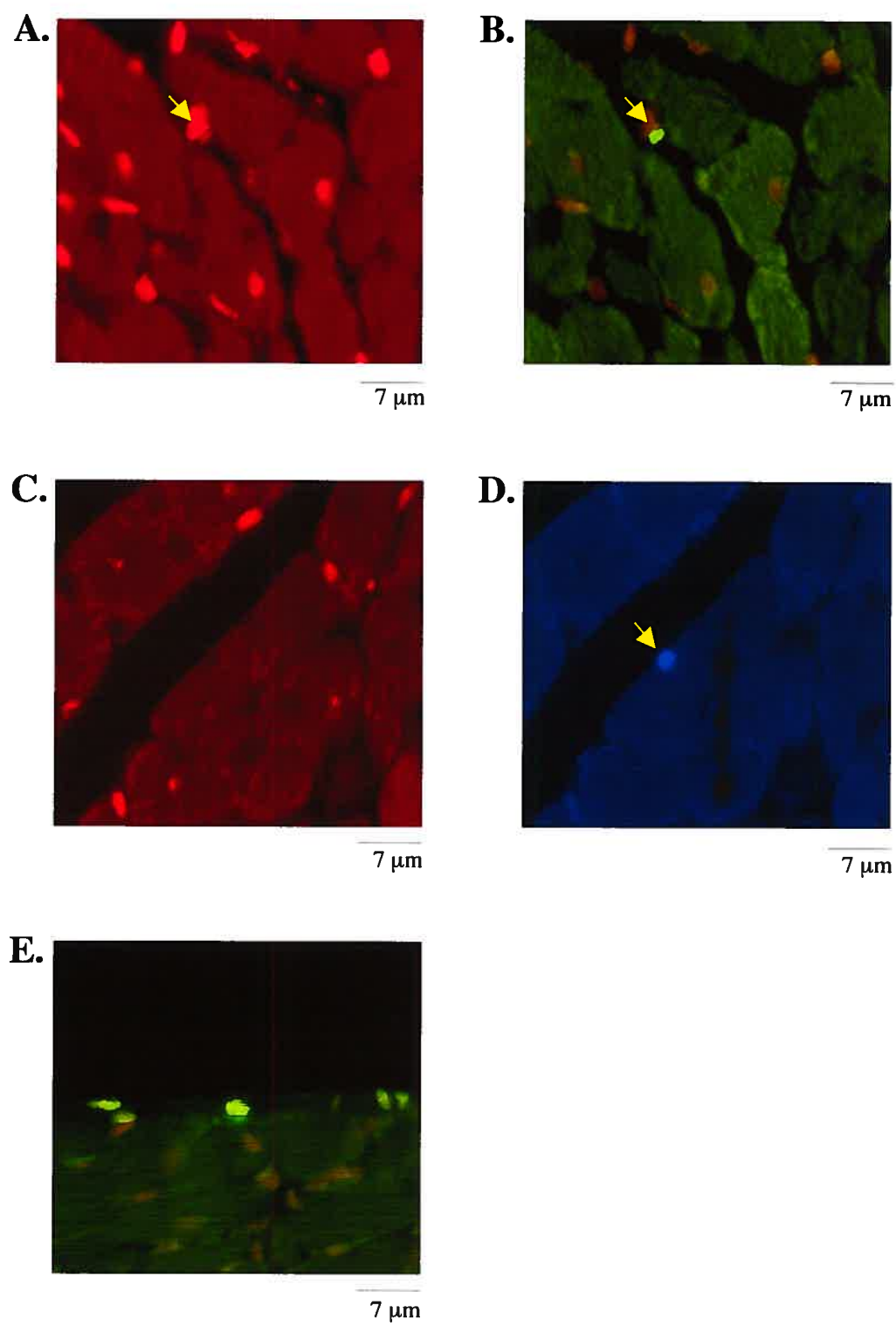
FIGURE 1

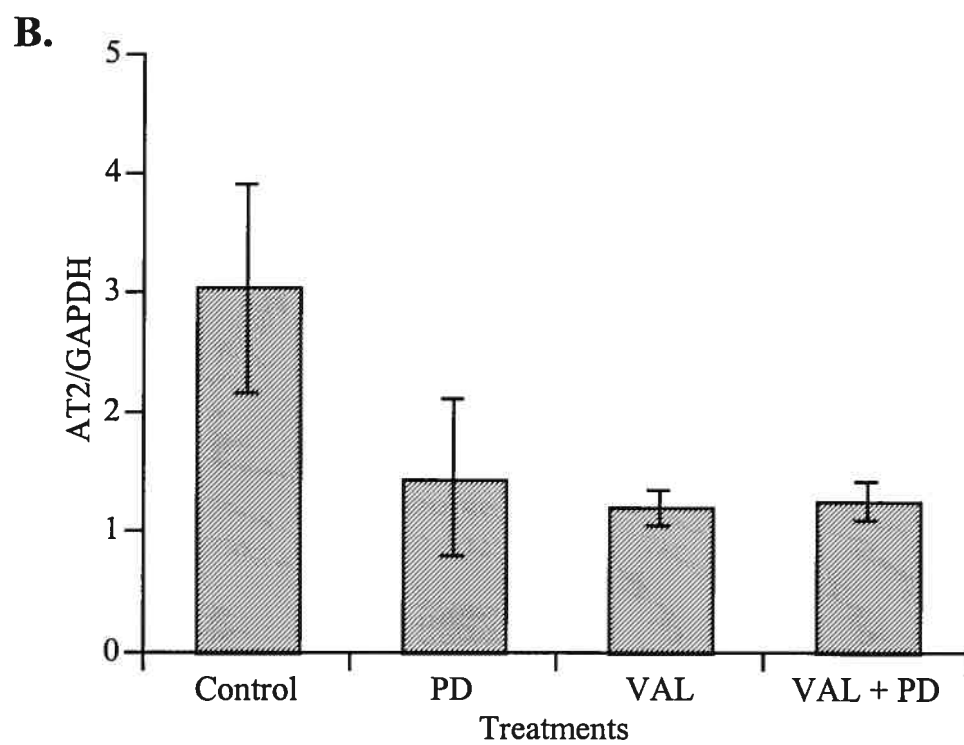
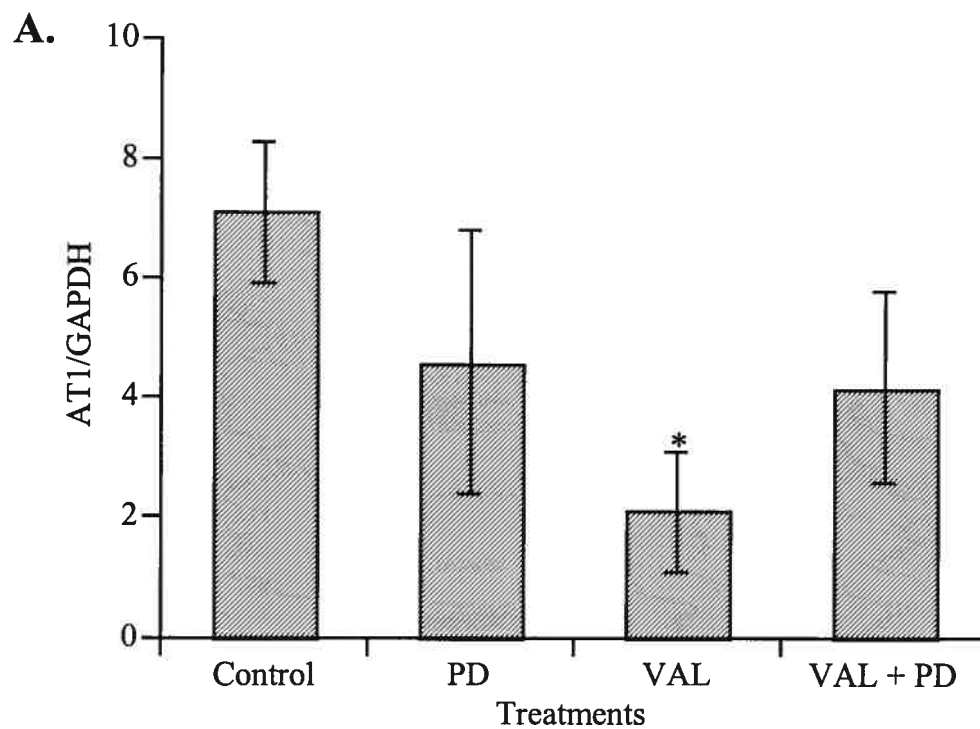
FIGURE 2

FIGURE 3

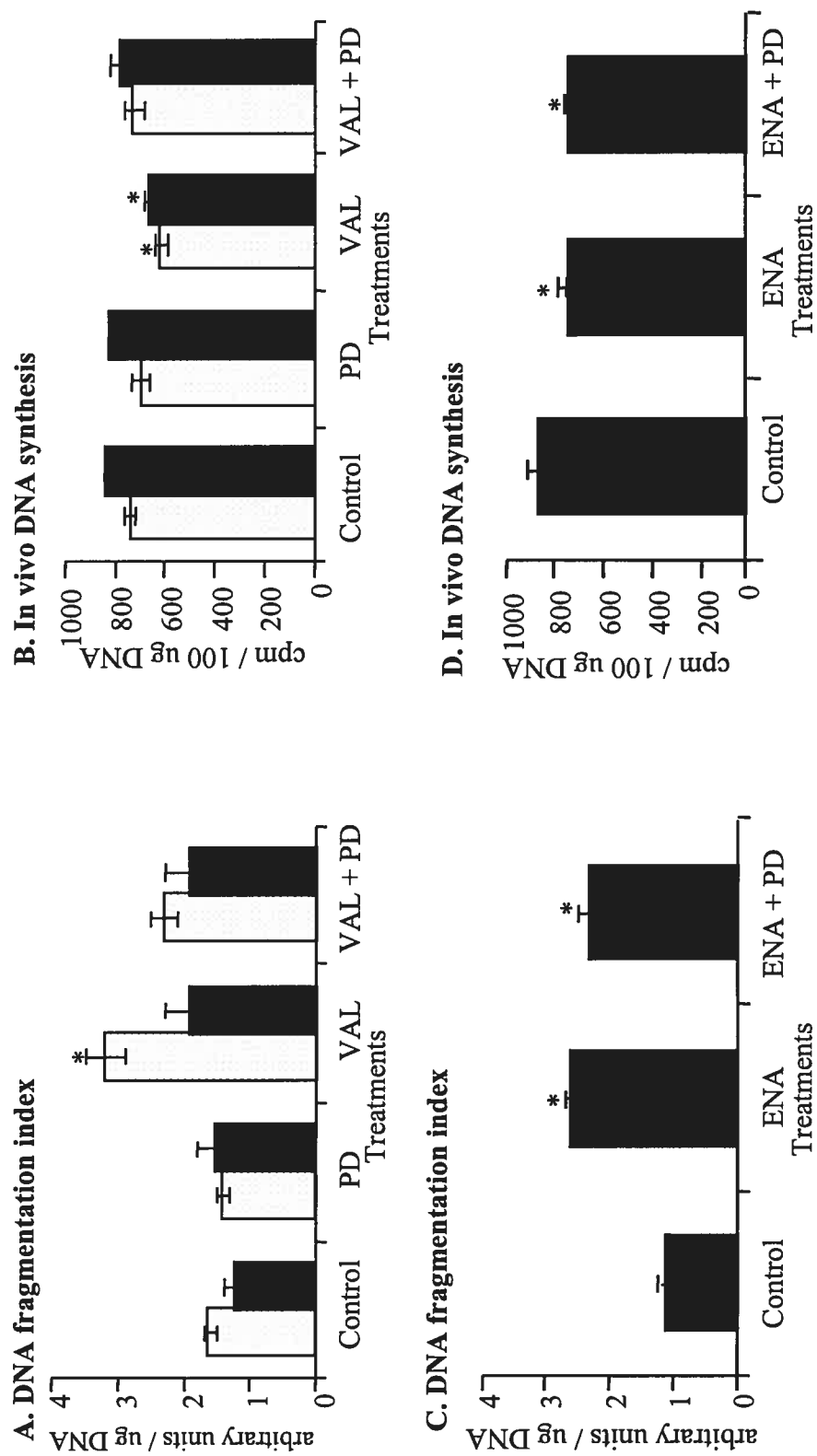


FIGURE 4

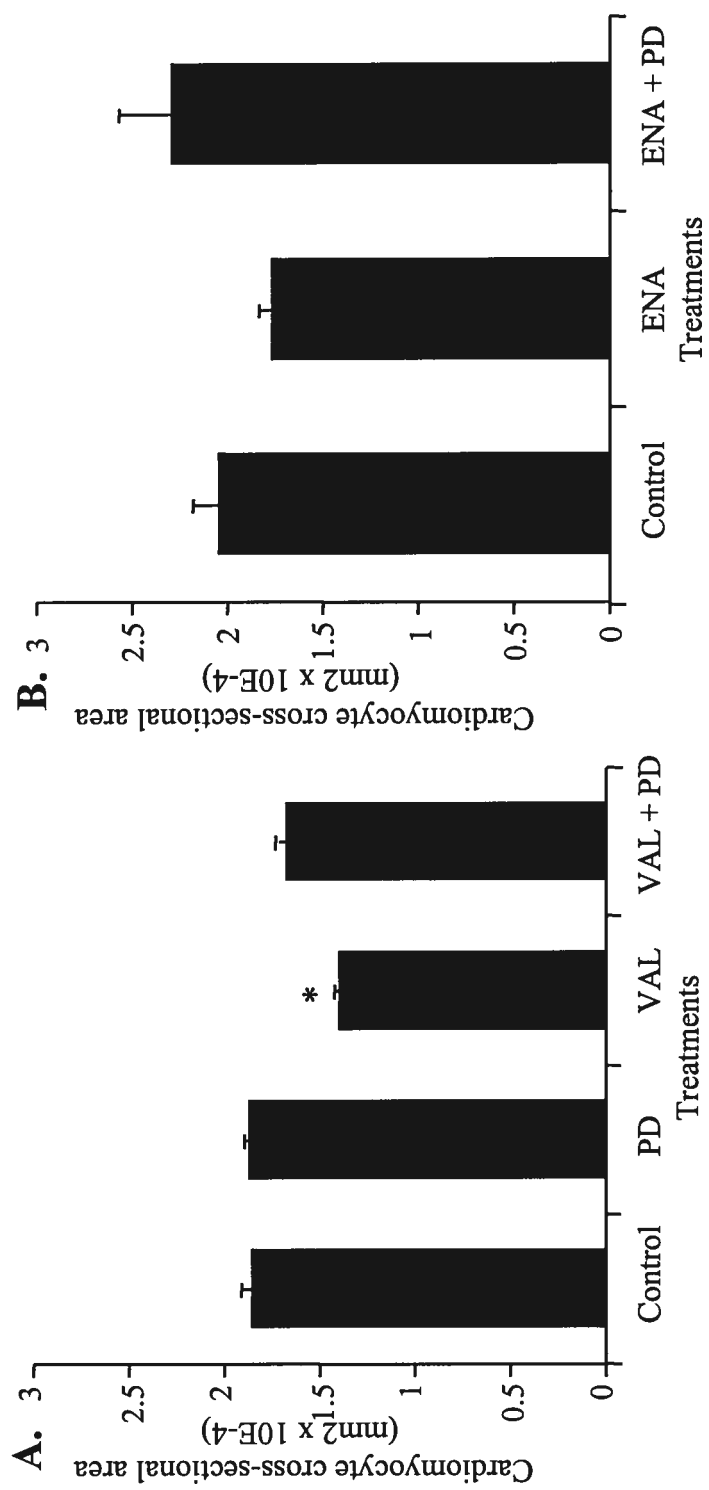


FIGURE 5

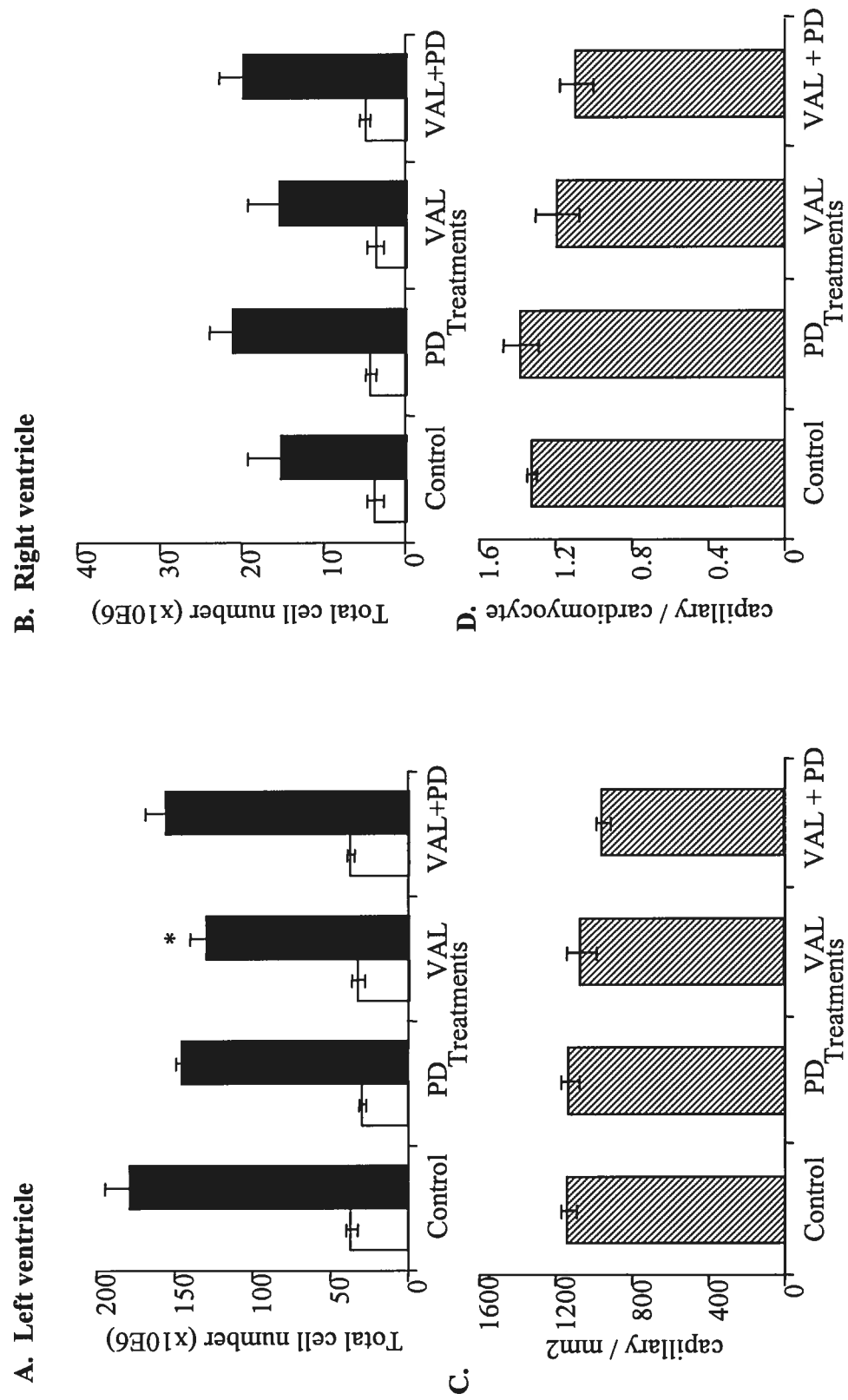


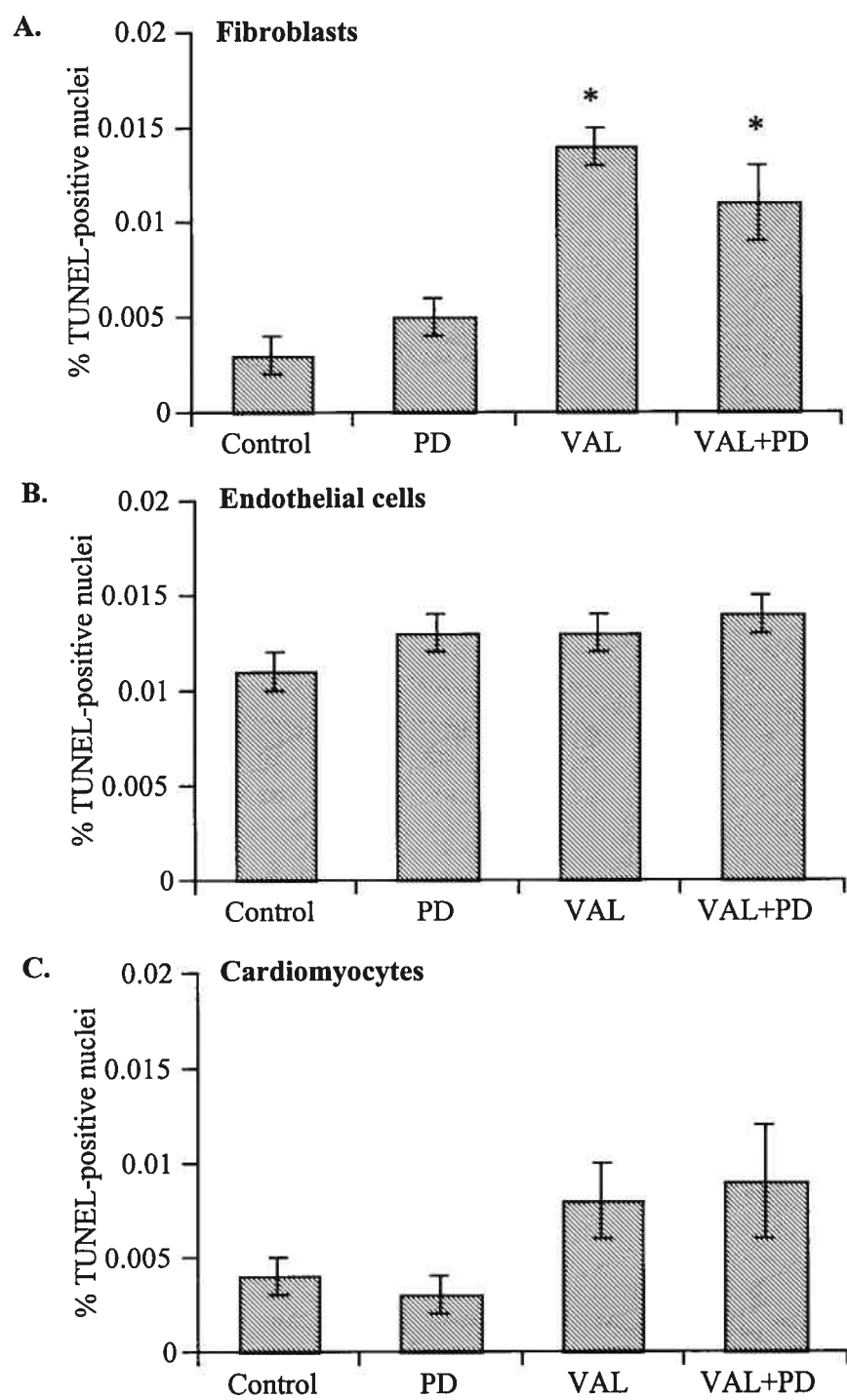
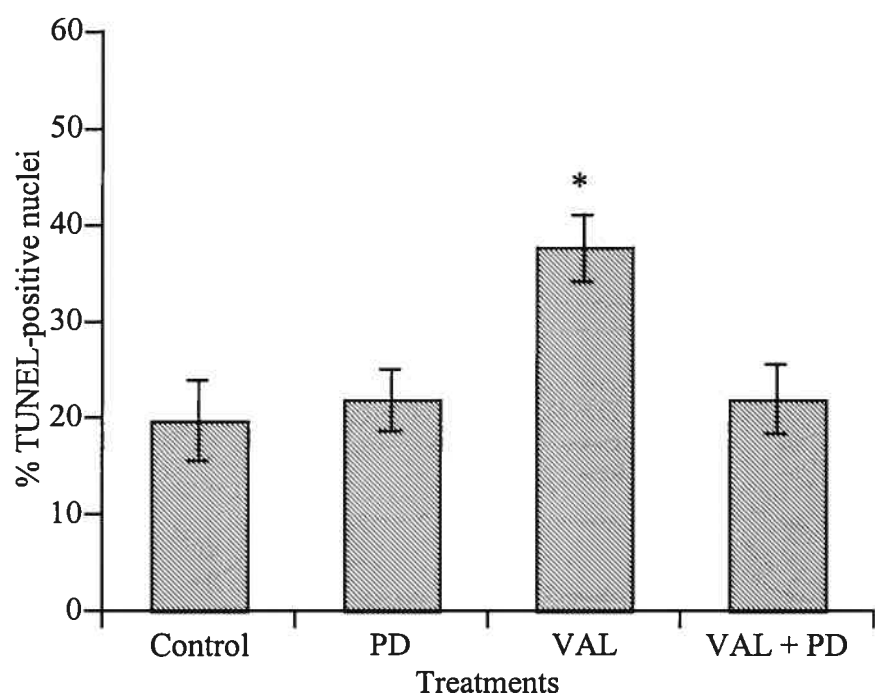
FIGURE 6

FIGURE 7

CHAPITRE 4

SYNERGISTIC INTERACTION BETWEEN ENALAPRIL, L-ARGININE AND TETRAHYDROBIOPTERIN IN SMOOTH MUSCLE CELL APOPTOSIS AND AORTIC REMODELING INDUCTION IN SHR

Shant Der Sarkissian, Eve-Lyne Marchand, David Duguay, Denis deBlois¹

Short title: Der Sarkissian et al – BH₄ potentiates proapoptotic effect of ACEi

Department of pharmacology, University of Montreal,
University of Montreal Hospital (CHUM) Research Center
3840 St. Urbain St., room 7-132B, Montreal, Quebec H2W 1T8, Canada

¹Tel.: (514) 890-8000 ext. 12919, Fax: (514) 412-7152, email:

[REDACTED]

¹Author for correspondence

Word count: 5,054

4.1. ABSTRACT

1. Smooth muscle cell (SMC) apoptosis occurs at the onset of enalapril-induced regression of aortic hypertrophy in SHR. A potential mechanism is the correction of endothelial dysfunction (ED) leading to reduced production of reactive oxygen species and enhanced bioavailability of nitric oxide (NO), a potent apoptosis inducer. Stimulants of NO include the precursor L-arginine and the NO synthase cofactor tetrahydrobiopterin (BH₄) which correct ED in several models.
2. The objective was to examine the relationships between ED and the cell growth / death balance during vascular remodeling induced by enalapril in SHR.
3. Ten week-old SHR received enalapril (ENA: 30 mg/kg/day p.o.) for 1 or 2 weeks, or a co-treatment of L-arginine (2.0 g/kg/day p.o.) and BH₄ (5.4 mg/kg/day i.p. twice daily) administered alone (group: LB) or in combination with enalapril (ENA+LB) for 1 week. Controls received vehicle.
4. After 1 week, ED was completely corrected with LB but not affected significantly by ENA whereas both treatments failed to induce SMC apoptosis or aortic remodeling. The correction of ED and the induction of SMC apoptosis (3.7-fold increase in TUNEL labeling) required 2 weeks of ENA treatment. The combination of LB with ENA for 1 week, however, was additive for the reduction of SMC proliferation, and synergistic for the induction of apoptosis and regression of vascular hypertrophy. These interactions were independent of blood pressure regulation.
5. Our results suggest that the correction of ED is not sufficient to induce SMC apoptosis and vascular remodeling, although facilitates these effects during enalapril treatment.

Keywords: endothelial dysfunction, apoptosis, enalapril, tetrahydrobiopterin, nitric oxide, hypertension.

Abbreviations: BH₄, tetrahydrobiopterin; ED, endothelial dysfunction; NO, nitric oxide; SHR, spontaneously hypertensive rat; SMC, smooth muscle cell.

4.2. INTRODUCTION

Hypertension is associated with endothelial dysfunction (ED), which is characterized by an increased production of reactive oxygen species (ROS) and a decreased bioavailability and output of nitric oxide (NO). This impairs vasorelaxation¹⁻³ and vascular mass regulation by NO.

Tetrahydrobiopterin (BH₄), an essential cofactor of nitric oxide synthase (NOS), plays a key role in the generation of NO.⁴ BH₄ synthesis inhibition induces endothelial NOS (eNOS) dysfunction in isolated vessels, whereas its administration normalizes eNOS function in isolated spontaneously hypertensive rat (SHR) vasculature.⁵⁻⁹ In addition, aortic and cardiac eNOS dysfunction in SHR is corrected following long term treatment with certain classes of antihypertensive drugs such as ACE inhibitors, AT₁ antagonists¹⁰⁻¹² but not some vasodilators.¹³ We have previously reported that ACE inhibitors and AT₁ antagonists induce a transient wave of apoptosis in cardiac fibroblasts and aortic SMC leading to cardiovascular hypertrophy regression in SHR.¹⁴⁻¹⁷ Both SMC apoptosis and the onset of aortic mass regression are prevented by the co-administration of a caspase inhibitor in SHR treated with an AT₁ antagonist.¹⁸ In contrast, treatment with the vasodilator hydralazine does not affect ED, cardiovascular apoptosis or mass regression in SHR.¹³⁻¹⁵ *In vitro* studies have demonstrated that ROS such as superoxide (O₂⁻) increase cell growth or survival in smooth muscle cells (SMC) and fibroblasts,^{19,20} whereas NO elicits the opposite effect and induces apoptosis in these cells via cGMP-dependent and -independent pathways.²¹⁻²⁴ Overall, these studies suggest that the balance

between ROS and NO constitute a key determinant in the control of cell fate. Therefore, we postulated that normalization of endothelial dysfunction may be a key determinant of apoptosis regulation and cardiovascular DNA content in enalapril-treated rats. To promote endothelial function, we have designed an "NO enhancing therapy" in which L-arginine, the precursor molecule of NO, and BH₄ are supplemented. The results suggest a synergistic interaction between endothelial function and enalapril in regulating SMC apoptosis leading to vascular remodeling.

4.3. METHODS

Animal procedures

Seventy-three 10 week-old male SHR were purchased (Charles-River, St-Constant, QC) and housed for at least 10 days before the initiation of the study. Food and water were administered *ad libitum*. Rats (n=5-11/group) were treated for 1 or 2 weeks with the ACE inhibitor enalapril (ENA: 30 mg/kg/day p.o.; Sigma Chemicals, St-Louis, MO), an "NO enhancing therapy" (LB): L-arginine (2 g/kg/day p.o., Sigma Chemicals, St-Louis, MO) + (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin (BH₄: cumulative dose 10.8 mg/kg; Schircks Laboratories, Jona, Switzerland) dissolved in saline and given fractionally in two i.p. injections per day, or a combination of both treatments (ENA+LB). Control rats received vehicle according to the same administration schedule as treated animals. Moreover, subsets of SHR were treated with L-arginine and BH₄ separately. Systolic blood pressure was determined in conscious restrained rats by the tail-cuff method as we described previously.¹⁴ Rats were anesthetized with a single i.m. injection of a mixture of ketamine (80 mg/kg; MTC Pharmaceuticals, Cambridge, ON), xylazine (4 mg/kg; Bayer, Etobicoke, ON), and acepromazine (2 mg/kg; Ayerst, Montreal, QC). In order to evaluate vascular DNA synthesis *in vivo* a subgroup of rats received a single i.v. bolus of [³H]-thymidine (0.5 mCi/kg;

New England Nuclear, Mississauga, ON) after induction of anesthesia at 1.5 hour prior to sacrifice. Death was induced by exsanguination by draining via the jugular vein. The thoracic aorta was isolated, cleaned of adherent tissue and a vascular segment (3mm) between the 3rd and 4th intercostal arteries was fixed in 4% paraformaldehyde and later paraffin-embedded for *in situ* histological studies. In a subgroup of rats, a segment was placed in cold Krebs solution for immediate vasoreactivity studies. The rest of the aortic media was denuded of endothelium, snap-frozen and pulverized in liquid nitrogen and stored at -80°C until further processing for DNA internucleosomal fragmentation (hallmark feature of apoptosis), synthesis and content measurements, as described previously.¹⁴ All animal manipulations were conducted according to institutional guidelines.

Vasoreactivity

Freshly isolated aortic rings were placed in organ chambers filled with oxygenated (95% O_2 -5% CO_2) 37°C Krebs solution (in mM: dextrose, 11; NaCl, 117.5; MgSO_4 , 1.18; KH_2PO_4 , 1.2; NaHCO_3 , 25; KCl, 4.7; CaCl_2 , 2.5). Isometric contractions were measured with the use of isometric force transducers (Harvard Apparatus, Montreal, QC), and a computerized data acquisition system (Biopac System, Harvard Apparatus, Montreal, QC). Tissues were subjected to 1.0g of tension and intrinsic contractility was assessed by stimulating tissues with KCl (70 mM) as previously established.^{25,26} Indomethacin (10 μM ; Sigma Chemicals, St-Louis, MO) was added in order to block vasoactive prostaglandins. Five minutes prior to assay, segments of aortic rings from each rat were incubated with catalase (1200 units/ml; Roche, Indianapolis, IN) or superoxide dismutase (SOD: 150 units/ml; Sigma Chemicals, St-Louis, MO) for hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide (O_2^-) reduction respectively. Next, tissues were pre-contracted with phenylephrine (PE; 0.3mM; Sigma Chemicals, St-Louis, MO) and endothelium-dependent vasorelaxations were measured by exposing tissues to cumulative concentrations of acetylcholine (Ach: 1-1000 nM range). Relaxations

were expressed as a percentage of the PE-induced plateau of contraction. Following acetylcholine, a subset of the relaxed tissues were challenged with the NOS inhibitor N^G-nitro-L-arginine-methylester (L-NAME; 1-300 μ M; Calbiochem, San Diego, CA). Finally, tissue were contracted again with phenylephrine (0.3mM) and stimulated with sodium nitroprusside (1 nM-100 μ M; Sigma Chemicals).

Histology

Paraffin-embedded aortic segments were cut into 5 μ m sections, deparaffinized and stained with hematoxylin (Sigma Chemicals, St-Louis, MO). Arterial sections were captured at 40X magnification and digitized for medial cross-sectional area (CSA) measurements^{14,16} using the NIH Image 1.61 program (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>).

SMC nuclei showing evidence of internucleosomal DNA fragmentation were detected *in situ* using a fluorescent terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) assay using biotin-16-dUTP (Roche, Indianapolis, IN) and FITC-labeled Extravidin (Sigma Chemicals, St-Louis, MO) as tracers and propidium-iodide as a counterstain as described previously.¹⁷ Negative controls had water instead of tdt.

Image analysis of TUNEL-positive nuclei was performed in a blinded manner using a fluorescence microscope with appropriate filters. Every TUNEL-positive SMC nuclei per cross-section was counted.

Statistical analysis

Values are presented as mean \pm SEM. Data from treated groups were compared with those of control group by two-way analysis of variance (ANOVA) and unpaired Student's t-test with Bonferroni/Dunn correction for multiple

comparisons. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Because the data on vascular reactivity and remodeling obtained in rats treated with enalapril for 1 week were similar in the time course study and in the drug combination study, data from these rat were pooled in order to increase the statistical power of our analysis.

4.4 RESULTS

Enalapril time course study

Pretreatment values of body weight were 250 ± 1 g ($n=15$). All rats gained weight during the experiment and final body weight values were similar between all groups (not shown). In rats treated with enalapril high blood pressure was significantly reduced after 6 and 12 days (144 ± 2 and 147 ± 6 mmHg, respectively) as compared to age-matched controls (182 ± 4 and 190 ± 2 mmHg, respectively).

Correction of endothelial dysfunction in SHR aortic rings precontracted with phenylephrine was measured by the catalase-resistant components of vasorelaxations in response to increasing cumulative concentrations of Ach in the presence of indomethacin. The contractile response to KCl or phenylephrine were not significantly different between placebo (0.80 ± 0.10 g and 1.16 ± 0.12 g, respectively) and enalapril treated groups (not shown). In control animals, the vasorelaxation curve of the catalase group (NO-mediated relaxation) was significantly shifted towards the right as compared to the vehicle group (NO and H_2O_2 -mediated relaxations) (Figure 1a). This effect of catalase was still present after 1 week but not 2 weeks of enalapril treatment (Figure 1b and 1c). These results suggested correction of ED at 2 weeks of enalapril treatment. In this study, incubation of aortic rings with SOD had no significant effect on Ach-induced vasorelaxations in all time points studied. Finally, relaxations in response to

sodium nitroprusside were maximal in all groups and unaffected by treatment (not shown).

As we have previously reported, there was no significant change in TUNEL labeling in SHR treated with enalapril for 1 week as compared to controls. However, in SHR treated with enalapril for 2 weeks and consistent with the time course of correction of ED, TUNEL labeling in the aortic medial segment revealed a significant 3.7-fold increase in apoptotic nuclei (Figure 2c).

L-arginine + BH₄ combination therapy study

Our preliminary data indicated that treatment with L-arginine or BH₄ administered alone for one week failed to modulate vascular growth, apoptosis or remodeling in animals treated with placebo or enalapril (data not shown). We postulated that a co-treatment with these drugs may be more potent in stimulating vascular remodeling. Thus, the co-administration of L-arginine and BH₄ (LB group) was examined alone or in combination with enalapril at 1 week.

Pretreatment values of body weight were 249 ± 2 g (n=54). All rats gained weight during the experiment but final values of body weight were similar between all groups (not shown). High blood pressure was significantly reduced after 6 days of treatment with enalapril alone or in combination with LB as compared to controls, whereas LB alone had no significant effect versus controls (Figure 3).

The correction of endothelial dysfunction in SHR treated with enalapril or LB, alone or combined was measured in aortic rings by the catalase-resistant components of Ach-induced vasorelaxations as described above. The contractile responses to KCl or phenylephrine were not significantly different between placebo and treated groups (not shown). A 1-week treatment with LB alone or in combination with enalapril abolished the sensitivity to catalase, suggesting the correction of ED (Figures 1d, 1e). Incubation of aortic rings with SOD had no

significant effect on vasorelaxations. Following relaxation with Ach, rings incubated in the absence of catalase or SOD were immediately stimulated with L-NAME. This elicited a dose-dependent increase in vascular tone (Figure 4). A two-way ANOVA revealed that contractile responses to L-NAME were significantly enhanced in tissues from rats treated with LB in combination with enalapril. Finally, relaxations in response to sodium nitroprusside were maximal in all groups and unaffected by treatment (not shown). These data suggest that acetylcholine-induced vasorelaxations were attributable to NO synthase activity.

Whereas a 1 week treatment with enalapril or with LB alone did not significantly increase the levels of internucleosomal DNA fragments in extracted DNA, the combination of both treatments stimulated a 9.7-fold increase in fragmentation values (versus controls: 0.53 ± 0.18 arbitrary units/ μg DNA; Figure 5a). This synergistic interaction of treatments on apoptosis induction was corroborated by values obtained from TUNEL labeling. Co-treatment of enalapril and LB caused a significant 4.9-fold increase in TUNEL-positive nuclei in the aortic media whereas enalapril or LB applied separately had no effect (Figure 6). Incorporation of [^3H]-thymidine into aortic DNA was significantly reduced by enalapril and LB (by 27% and 19% respectively). However the combination of enalapril and LB elicited an additive 51% decrease of DNA synthesis (Figure 5b). At this early time point (1 week), DNA content in the aortic media was not significantly affected by the treatments with enalapril and LB applied alone or in combination versus controls (1.48 ± 0.33 $\mu\text{g}/\text{mm}$). Treatment with enalapril or LB alone did not affect aortic CSA whereas the combination of enalapril and LB elicited a 13% decrease indicative of hypertrophy regression (Figure 5c).

4.5. DISCUSSION

The endothelium produces several relaxing factors such as EDHF, PGI_2 and NO. The latter is derived from the transformation of the amino acid L-arginine into citrulline by the activity of NOS under the influence of agonists and mechanical forces such as shear stress.²⁷ Three NOS isoforms are present in the vasculature namely the endothelial NOS (eNOS), the neuronal (nNOS) and the inducible (iNOS). The primary NOS isoform is the endothelial NOS (eNOS), however, it has been suggested that the neuronal NOS (nNOS) may be up-regulated in SMC as a compensatory mechanism to ED²⁸ therefore a role for nNOS cannot be excluded, whereas iNOS is cytokine induced in tissues during inflammation. In addition, endothelial cells can produce contracting factors including prostanoids (TXA_2 and PGH_2), ET-1 and ROS such as O_2^- which counteract with the relaxing activity of NO.²⁷ Moreover, ROS can impair endothelial function by causing NO breakdown and conversion into the potent pro-oxidant peroxynitrite.

The activity of all three NOS isoforms and formation of NO is dependent on the presence of optimal concentrations of its critical co-factor BH_4 .²⁹⁻³⁴ Accordingly, several studies have demonstrated the critical implication of BH_4 in endothelial homeostasis^{35,36} while others have suggested a direct antioxidant mechanism for BH_4 .³⁷ Biochemical studies have demonstrated that suboptimal concentrations of BH_4 lead to production of H_2O_2 ³⁸ that can mediate endothelium-dependent relaxations. However, H_2O_2 is a sluggish oxidant and may lead to oxidative vascular injury upon sustained production.⁷ In addition, H_2O_2 is implicated in intracellular signaling leading to cell proliferation in vascular smooth muscle cells stimulated with AngII (via AT_1 receptors).³⁹

Vascular oxidative stress due to dysregulation of endothelial function contributes to the pathophysiology of cardiovascular diseases including hypertension. Loss of homeostatic balance between cellular growth and death remains at the basis of morbidity such as hypertrophy and atherosclerosis. Potential underlying mechanisms are provided by a growing body of evidence demonstrating that while H_2O_2 and ROS increase cell growth or survival in cell types such as SMC and fibroblasts,^{19,20} NO exerts the opposite effect in those cells.²² We previously demonstrated that ACE inhibitors and angiotensin AT_1 receptor antagonists reverse the early stages of cardiovascular remodeling in SHR by altering degrees of cellular proliferation and/or its essential counterpart, apoptosis.^{14-17,40} We provided evidence that renin-angiotensin system inhibitors are equipotent in inducing apoptosis in aortic SMC^{14,40} and interstitial cardiac fibroblast¹⁷ during regression of cardiovascular hypertrophy. In retrospect, it appeared that antihypertensive drugs known to normalize endothelial function also share the ability to induce apoptosis during regression of cardiovascular hypertrophy. Therefore, it seems that ED favors cardiovascular growth while its restoration favors regression of cardiovascular hypertrophy. In order to examine the relationship between correction of ED and vascular remodeling, we tested various drug combinations to enhance vascular NO output. In preliminary experiments, the administration of L-arginine or BH_4 alone did not elicit vascular remodeling within one week. This was seen in animals receiving placebo or enalapril. Thus we tested these drugs in combination in animals treated with or without enalapril for 1 week.

Administration of L-arginine and BH_4 completely corrected ED, as interpreted by the loss of H_2O_2 mediated vasorelaxations. Co-administration of enalapril did not alter L-arginine and BH_4 's combined effect on restoration of endothelial function. Interestingly, L-NAME-induced contractions were potentiated significantly only in animals treated with the combination of L-arginine, BH_4 and enalapril, i.e. the

drug combination that induced SMC apoptosis and vascular remodeling. These data suggest increased vascular NOS activity in animals receiving tri-therapy. The relative contribution of eNOS and nNOS activity to these changes remains to be better defined. The activity of nNOS in SHR vessels was not assessed because of the lack of specific inhibitors for this NOS isoform. Oxidative stress and nNOS expression are enhanced in arterial SMC of SHR or AngII-infused rats⁴¹ but the time course for the down-regulation of these effects by enalapril in SHR remains unclear. It is intriguing to speculate that enalapril reduction of AT₁-dependent oxidative stress within SMC may enhance the local bioavailability of NO produced by residual nNOS during the first week of enalapril. This effect would not be detected by stimulating aortic rings with acetylcholine but may explain the greater contractile effects of L-NAME in vessels with tri-therapy. Enhanced bioavailability of NO from nNOS, in combination with the rapid correction of eNOS dysfunction induced by L-arginine and BH₄, may result in enhanced total vascular NO output, thus triggering SMC apoptosis and vascular remodeling. Suppression of SMC DNA synthesis was observed in aortic extracts from SHR treated with enalapril and with L-arginine + BH₄ for 1 week, whereas the combination of both treatments had an additive effect on DNA synthesis reduction suggesting the activation of common pathways.

Consistent with our previous observations,¹⁴ enalapril induced SMC apoptosis after 2 but not 1 week of administration and aortic apoptosis correlated in time with the correction of ED during enalapril treatment. Moreover, a 1 week treatment with L-arginine + BH₄ alone had no effect on aortic apoptosis measured by oligosomal DNA fragmentation and TUNEL assays. Interestingly, the combination of both enalapril and L-arginine + BH₄ treatments had a synergistic interaction on SMC apoptosis stimulation independently of blood pressure regulation since L-arginine + BH₄ treatment had no hemodynamic effect. This synergistic response may reflect the cumulative pro-apoptotic and anti-growth

effects of NO-dependent and independent pathways. NO is a known inducer of apoptosis in cultured SMC whereas AT₁ receptors for AngII elicit anti-apoptotic effects in those cells.⁴² Cardiovascular diseases are often associated with a decreased bioavailability of NO and increased levels of Ang II.⁴³ Our results are consistent with the notion that the balance between NO and Ang II plays an important role in the modulation of vascular structure.

Some of our results suggest that the correction of ED is associated with the induction of SMC apoptosis, i.e. with enalapril alone (at 2 weeks) or with enalapril in combination with L-arginine + BH₄ (at 1 week). However, correction of ED alone with L-arginine + BH₄ did not induce SMC death. Together, these data suggest that correction of ED is not sufficient although it may be permissive for SMC apoptosis induction during regression of vascular hypertrophy with ACE inhibitors. The kinin/NO pathway is an interesting candidate pathway for apoptosis induction in this model. ACE inhibitors decrease kinin degradation which promote the release of NO via the activation of endothelial B1 and B2 receptors.^{23,42,44} Activation of the kinin/NO pathway reduces cardiovascular mass during ACE inhibition,^{45,46} decreases excessive deleterious Ang II production¹ and prevents kinin B2 receptor desensitization.^{47,48}

The cumulative effects of both enhanced DNA synthesis reduction and synergistic interaction on apoptosis stimulation with the combination of both enalapril, L-arginine + BH₄ treatments was associated with a significant reduction of aortic mass. Consistent with our previous observations,¹⁴ DNA content was not yet reduced at the early time of 1 week of enalapril treatment. It is tempting to speculate that the modulation of SMC growth and apoptosis by the combined treatment with LB and enalapril would result in regression of SMC number at later time point.

Endothelial dysfunction promotes vascular complications in hypertension. Normalization of endothelium function by such an "NO enhancing therapy" as described herein or by chronic supplementation of folates that increase BH₄ availability,^{37,49} could constitute an important goal for antihypertensive therapy. The synergistic interaction of our "NO enhancing therapy" on enalapril's ability in SMC apoptosis induction during vascular hypertrophy regression reveals possible new avenues for aggressive therapeutic intervention in cardiovascular remodeling.

Acknowledgements

This work was supported in part by a grant from the Canadian Institute of Health Research (CIHR; MOP-4252). D. DeBlois is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. S. Der Sarkissian and E-L. Marchand both hold a studentship from the Heart and Stroke Foundation of Canada in partnership with the Canadian Institutes for Health Research. D.Duguay holds an award from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

4.6. REFERENCES

1. Boulanger CM. Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31:39-49.
2. Crabos M, Coste P, Paccalin M, Tariosse L, Daret D, Besse P, Bonoron-Adele S. Reduced basal NO-mediated dilation and decreased endothelial NO- synthase expression in coronary vessels of spontaneously hypertensive rats. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29:55-65.
3. Tschudi MR, Mesaros S, Luscher TF, Malinski T. Direct in situ measurement of nitric oxide in mesenteric resistance arteries. Increased decomposition by superoxide in hypertension. *Hypertension.* 1996;27:32-35.
4. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Faseb J.* 1992;6:3051-3064.
5. Yang D, Levens N, Zhang JN, Vanhoutte PM, Feletou M. Specific potentiation of endothelium-dependent contractions in SHR by tetrahydrobiopterin. *Hypertension.* 2003;41:136-142.
6. Katusic ZS. Vascular endothelial dysfunction: does tetrahydrobiopterin play a role? *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;281:H981-986.
7. Cosentino F, Katusic ZS. Tetrahydrobiopterin and dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in coronary arteries. *Circulation.* 1995;91:139-144.
8. Cosentino F, Patton S, d'Uscio LV, Werner ER, Werner-Felmayer G, Moreau P, Malinski T, Luscher TF. Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. *Journal of Clinical Investigation.* 1998;101:1530-1537.
9. Cosentino F, Luscher TF. Tetrahydrobiopterin and endothelial nitric oxide synthase activity. *Cardiovasc Res.* 1999;43:274-278.
10. Tschudi MR, Criscione L, Novosel D, Pfeiffer K, Luscher TF. Antihypertensive therapy augments endothelium-dependent relaxations in

coronary arteries of spontaneously hypertensive rats. *Circulation*. 1994;89:2212-2218.

11. Rubanyi GM, Kauser K, Graser T. Effect of cilazapril and indomethacin on endothelial dysfunction in the aortas of spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993;22:S23-30.
12. Linz W, Wohlfart P, Schoelkens BA, Becker RH, Malinski T, Wiemer G. Late treatment with ramipril increases survival in old spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1999;34:291-295.
13. Clozel M, Kuhn H, Hefti F. Effects of angiotensin converting enzyme inhibitors and of hydralazine on endothelial function in hypertension. *Hypertension*. 1990;16:532-540.
14. deBlois D, Tea BS, Than VD, Tremblay J, Hamet P. Smooth muscle apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997;29:340-349.
15. Tea BS, Dam TV, Moreau P, Hamet P, deBlois D. Apoptosis during regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats: temporal regulation and spatial heterogeneity. *Hypertension*. 1999;34:229-235.
16. Tea BS, Der Sarkissian S, Touyz RM, Hamet P, deBlois D. Proapoptotic and Growth-Inhibitory Role of Angiotensin II Type 2 Receptor in Vascular Smooth Muscle Cells of Spontaneously Hypertensive Rats In Vivo. *Hypertension*. 2000;35:1069-1073.
17. Der Sarkissian S, Marchand EL, Duguay D, Hamet P, deBlois D. Reversal of interstitial fibroblast hyperplasia via apoptosis in hypertensive rat heart with valsartan or enalapril. *Cardiovasc Res*. 2003;57:775-783.
18. Marchand EL, Der Sarkissian S, Hamet P, DeBlois D. Caspase-Dependent Cell Death Mediates the Early Phase of Aortic Hypertrophy Regression in Losartan-Treated Spontaneously Hypertensive Rats. *Circ Res*. 2003.

19. Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 1997;96:3602-3609.
20. Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. Superoxide induces apoptosis in cardiomyocytes, but proliferation and expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts. *FEBS Lett*. 1999;448:206-210.
21. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *Journal of Clinical Investigation*. 1989;83:1774-1777.
22. Shin JT, Barbeito L, MacMillan-Crow LA, Beckman JS, Thompson JA. Acidic fibroblast growth factor enhances peroxynitrite-induced apoptosis in primary murine fibroblasts. *Arch Biochem Biophys*. 1996;335:32-41.
23. Fukuo K, Hata S, Suhara T, Nakahashi T, Shinto Y, Tsujimoto Y, Morimoto S, Ogihara T. Nitric oxide induces upregulation of Fas and apoptosis in vascular smooth muscle. *Hypertension*. 1996;27:823-826.
24. Khan S, Kayahara M, Joashi U, Mazarakis ND, Sarraf C, Edwards AD, Hughes MN, Mehmet H. Differential induction of apoptosis in Swiss 3T3 cells by nitric oxide and the nitrosonium cation. *J Cell Sci*. 1997;110:2315-2322.
25. Lemay J, Hou Y, deBlois D. Evidence that nitric oxide regulates AT1-receptor agonist and antagonist efficacy in rat injured carotid artery. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000;35:693-699.
26. Lemay J, Hou Y, Tremblay J, deBlois D. Angiotensin I-converting enzyme activity and vascular sensitivity to angiotensin I in rat injured carotid artery. *Eur J Pharmacol*. 2000;394:301-309.
27. Lüscher TF, Vanhoutte PM. *The endothelium : modulator of cardiovascular function*. Boca Raton: CRC Press; 1990.
28. Boulanger CM, Heymes C, Benessiano J, Geske RS, Levy BI, Vanhoutte PM. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth

- muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. *Circ Res.* 1998;83:1271-1278.
29. Tayeh MA, Marletta MA. Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *J Biol Chem.* 1989;264:19654-19658.
 30. Kwon NS, Nathan CF, Stuehr DJ. Reduced biopterin as a cofactor in the generation of nitrogen oxides by murine macrophages. *J Biol Chem.* 1989;264:20496-20501.
 31. Giovanelli J, Campos KL, Kaufman S. Tetrahydrobiopterin, a cofactor for rat cerebellar nitric oxide synthase, does not function as a reactant in the oxygenation of arginine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:7091-7095.
 32. Kaufman S. New tetrahydrobiopterin-dependent systems. *Annu Rev Nutr.* 1993;13:261-286.
 33. Baek KJ, Thiel BA, Lucas S, Stuehr DJ. Macrophage nitric oxide synthase subunits. Purification, characterization, and role of prosthetic groups and substrate in regulating their association into a dimeric enzyme. *J Biol Chem.* 1993;268:21120-21129.
 34. Gross SS, Levi R. Tetrahydrobiopterin synthesis. An absolute requirement for cytokine- induced nitric oxide generation by vascular smooth muscle. *J Biol Chem.* 1992;267:25722-25729.
 35. Ueda S, Matsuoka H, Miyazaki H, Usui M, Okuda S, Imaizumi T. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in long-term smokers. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35:71-75.
 36. Heitzer T, Brockhoff C, Mayer B, Warnholtz A, Mollnau H, Henne S, Meinertz T, Munzel T. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers : evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase. *Circ Res.* 2000;86:E36-41.
 37. Verhaar MC, Wever RM, Kastelein JJ, van Dam T, Koomans HA, Rabelink TJ. 5-methyltetrahydrofolate, the active form of folic acid,

- restores endothelial function in familial hypercholesterolemia. *Circulation*. 1998;97:237-241.
38. Mayer B, John M, Heinzl B, Werner ER, Wachter H, Schultz G, Bohme E. Brain nitric oxide synthase is a bipterin- and flavin-containing multi-functional oxido-reductase. *FEBS Lett*. 1991;288:187-191.
 39. Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, Taylor WR, Griendling KK. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension*. 1998;32:488-495.
 40. Der Sarkissian S, Tea B, Marchand E-L, Touyz RM, Hamet P, deBlois D. Cell type-specific pro-apoptotic role of angiotensin II type 2 receptor in the heart of spontaneously hypertensive rats (In preperation). *Hypertension*. 2003.
 41. Chin SY, Pandey KN, Shi SJ, Kobori H, Moreno C, Navar LG. Increased activity and expression of Ca(2+)-dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1999;277:F797-804.
 42. Pollman MJ, Yamada T, Horiuchi M, Gibbons GH. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circulation Research*. 1996;79:748-756.
 43. Gibbons GH. Mechanisms of vascular remodeling in hypertension: role of autocrine-paracrine vasoactive factors. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1995;4:189-196.
 44. Berthiaume N, Hess F, Chen A, Regoli D, D'Orleans-Juste P. Pharmacology of kinins in the arterial and venous mesenteric bed of normal and B2 knockout transgenic mice. *Eur J Pharmacol*. 1997;333:55-61.
 45. Linz W, Scholkens BA. A specific B2-bradykinin receptor antagonist HOE 140 abolishes the antihypertrophic effect of ramipril. *British Journal of Pharmacology*. 1992;105:771-772.

46. Wollert KC, Studer R, Doerfer K, Schieffer E, Holubarsch C, Just H, Drexler H. Differential effects of kinins on cardiomyocyte hypertrophy and interstitial collagen matrix in the surviving myocardium after myocardial infarction in the rat. *Circulation*. 1997;95:1910-1917.
47. Marcic B, Deddish PA, Jackman HL, Erdos EG. Enhancement of bradykinin and resensitization of its B2 receptor. *Hypertension*. 1999;33:835-843.
48. Minshall RD, Erdos EG, Vogel SM. Angiotensin I-converting enzyme inhibitors potentiate bradykinin's inotropic effects independently of blocking its inactivation. *Am J Cardiol*. 1997;80:132A-136A.
49. Verhaar MC, Wever RM, Kastelein JJ, van Loon D, Milstien S, Koomans HA, Rabelink TJ. Effects of oral folic acid supplementation on endothelial function in familial hypercholesterolemia : A randomized placebo-controlled trial. *Circulation*. 1999;100:335-338.

4.7. FIGURE LEGENDS AND FIGURES

Figure 1. Endothelium-dependant acetylcholine- (Ach) induced vasorelaxations in vehicle, catalase or SOD pre-incubated aortic rings of **a.** untreated controls, SHR treated with: **b.** enalapril (ENA) for 1 week, **c.** ENA for 2 weeks, **d.** L-arginine+BH4 (LB) for 1 week, **e.** or a combination of both ENA+LB for 1 week. Relaxations are expressed by the percentage response to phenylephrine (PE) pre-contraction. *Significantly different ($P < 0,05$) from vehicle group (n=5-11 per group).

Figure 2. Photomicrographs taken in the aortic media of SHR showing **a.** total SMC nuclei (bright red, sharply delineated spots) following propidium iodide staining, **b.** TUNEL-positive nuclei (bright green, sharply delineated) in the same field visualized under an FITC filter. **c.** Changes in the number of TUNEL-positive SMC nuclei per cross section of the aortic media in untreated Controls and SHR treated with enalapril (ENA) for 1 or 2 weeks. *Significantly different ($P < 0.05$) from Control group (n=5-8 per group)

Figure 3. Changes in systolic blood pressure in untreated (Control) and SHR treated for 1 week with enalapril (ENA), L-arginine+BH4 (LB), or a combination of both (ENA+LB). *Significantly different ($P < 0.05$) from Control group (n=5-11 per group).

Figure 4. L-NAME induced vascular contractile response in vehicle, catalase or SOD pre-incubated aortic rings of untreated (Control) and SHR treated for 1 week with enalapril (ENA), L-arginine+BH4 (LB), or a combination of both (ENA+LB). *Significantly different ($P < 0.05$) from Control (n=5-11 per group).

Figure 5. Changes in **a.** internucleosomal DNA fragmentation, **b.** DNA synthesis, **c.** medial cross sectional area in the aorta of untreated (Control) and SHR treated for 1 week with enalapril (ENA), L-arginine+BH4 (LB), or a combination of both (ENA+LB). *Significantly different ($P < 0.05$) from Control group (n=5-11 per group).

Figure 6: Changes in the number of TUNEL-positive SMC nuclei per cross section in the aortic media of untreated (Control) and SHR treated for 1 week with enalapril (ENA), L-arginine+BH4 (LB), or a combination of both (ENA+LB). *Significantly different ($P < 0.05$) from Control group (n=5-11 per group).

FIGURE 1

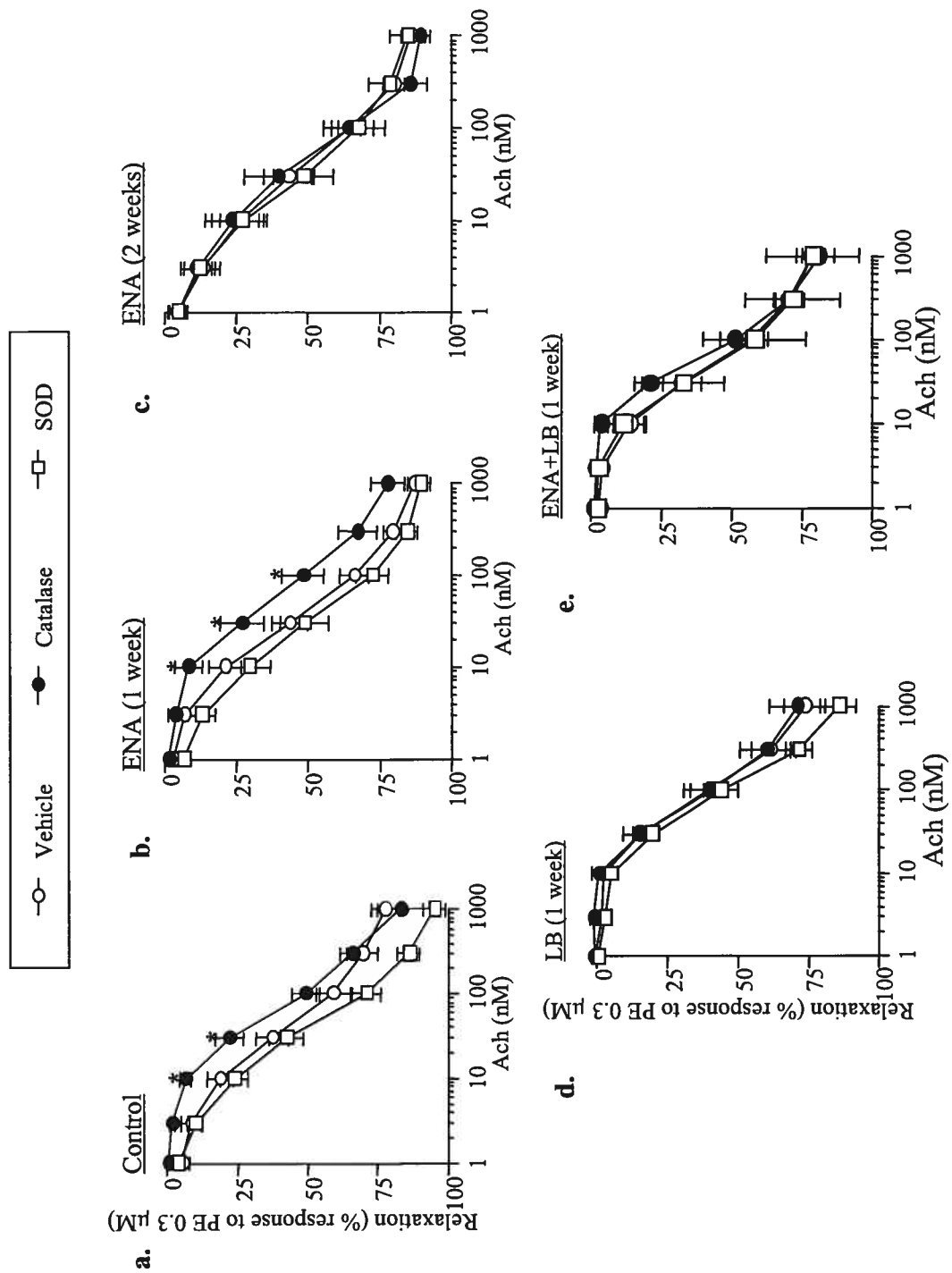


FIGURE 2

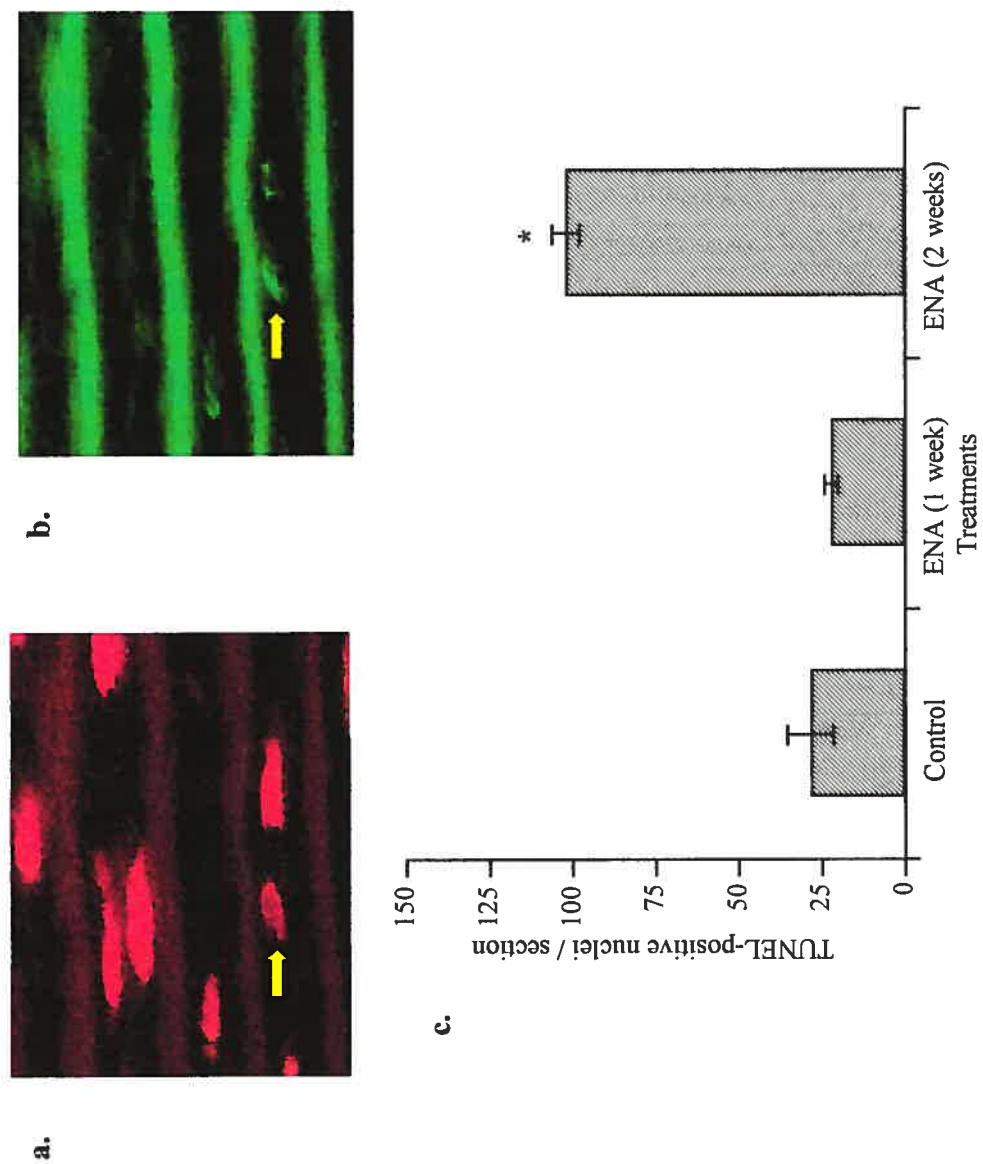


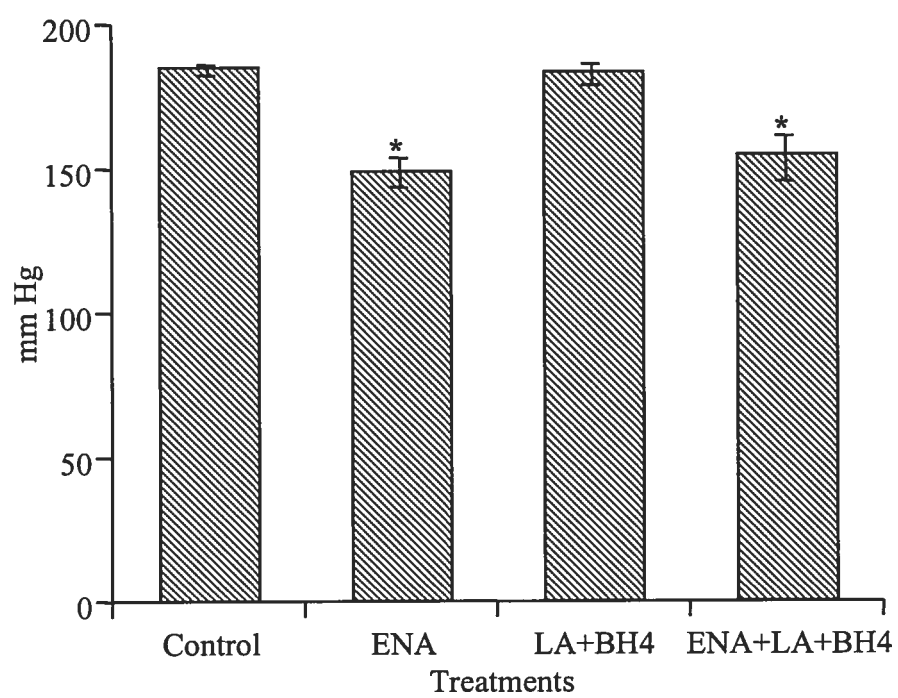
FIGURE 3

FIGURE 4

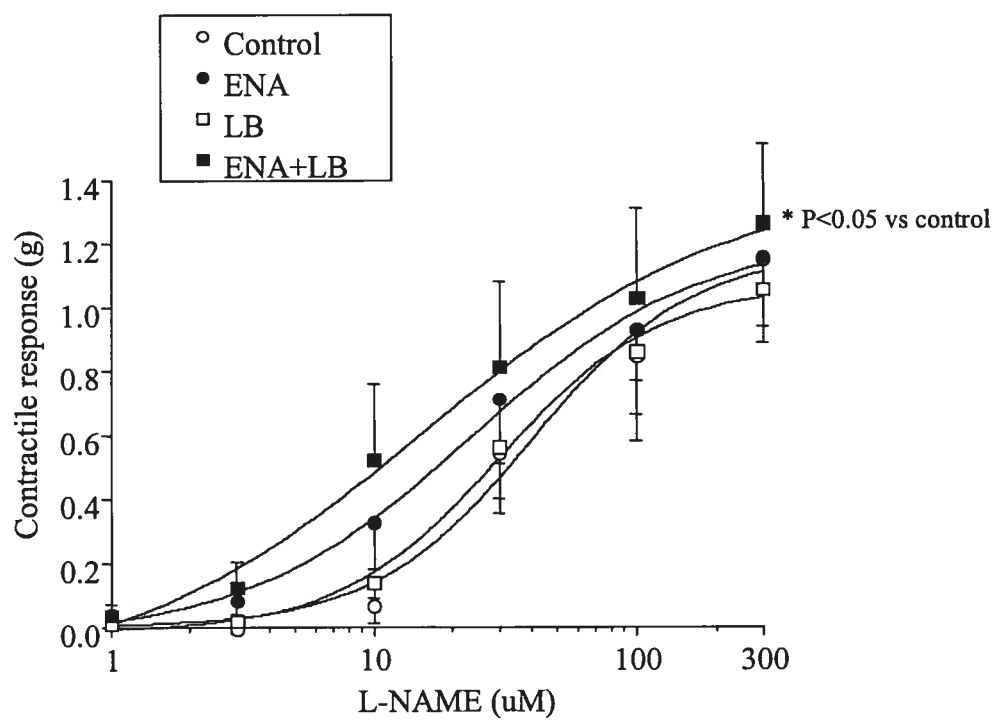


FIGURE 5

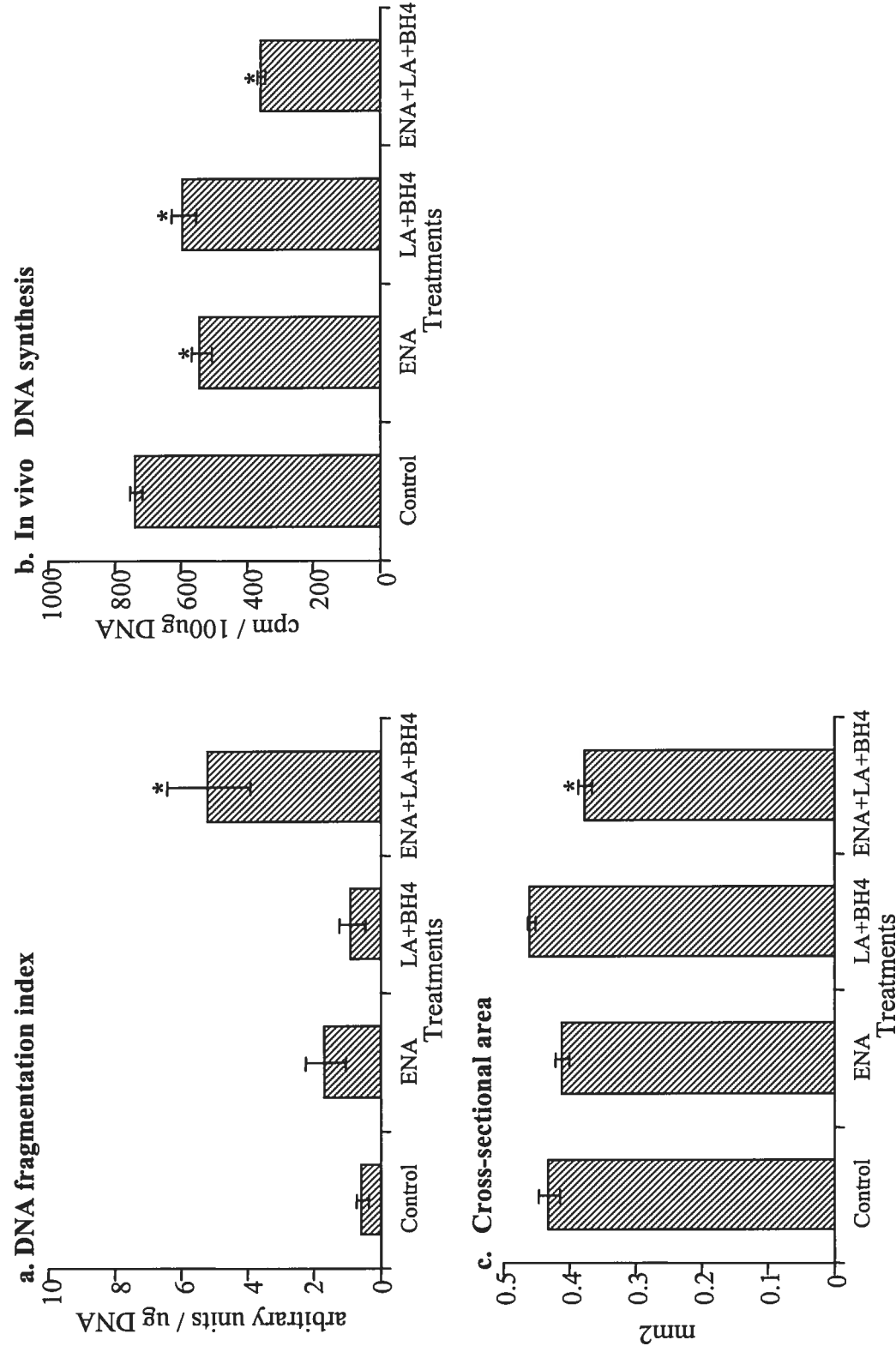
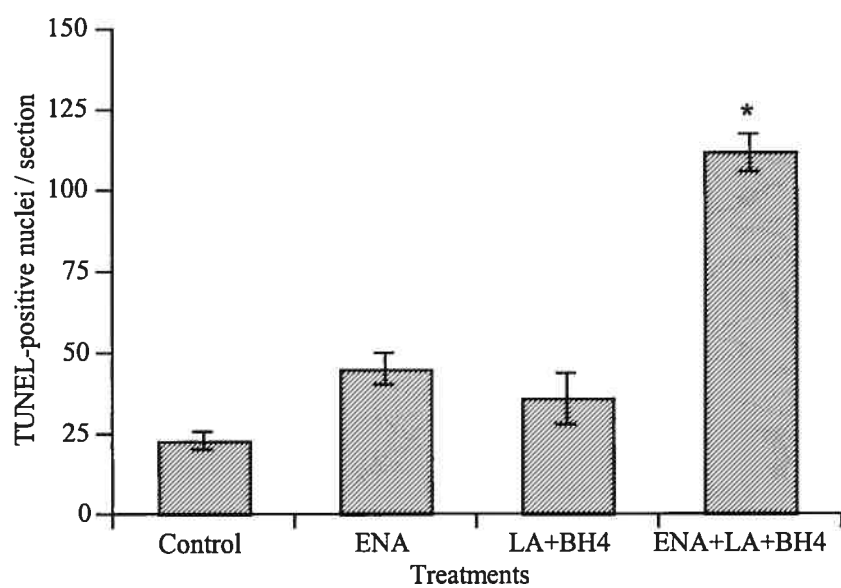


FIGURE 6

CHAPITRE 5

DISCUSSION

L'objectif général de cette thèse est d'évaluer l'implication des sous-types de récepteurs de l'angiotensine et de la correction de la dysfonction endothéliale dans la réponse apoptotique cellule-spécifique du système cardiovasculaire chez le SHR traité avec les bloqueurs du SRA (iECA ou antagonistes AT₁). L'objectif général est scindé selon les objectifs individuels des trois manuscrits soit :

Article 1) Identification du type cellulaire apoptotique dans le coeur

Article 2) Détermination du rôle des récepteurs AT₂ dans l'apoptose cardiaque

Article 3) Détermination de l'implication de la correction de la dysfonction endothéliale dans l'apoptose

Afin d'alléger et de rendre la discussion de l'objectif générale plus claire, les objectifs de chaque article seront discutés séquentiellement et les perspectives ainsi que les implications cliniques du projet de doctorat seront abordées subséquemment.

5.1. SÉLECTION DU MODÈLE

Le SHR âgé de onze semaines est un modèle expérimental où l'hypertension artérielle et le remodelage cardiovasculaire sont déjà bien établis. C'est un modèle génétique d'hypertension primaire très bien caractérisé au niveau du remodelage vasculaire et de l'hypertrophie/hyperplasie des organes cibles. Ce remodelage

cardiovasculaire est associé à une augmentation de la prolifération cellulaire apparente *in utero* et dans les premiers jours suivants la naissance, ainsi qu'à une atténuation des taux d'apoptose cumulatives par rapport aux tissus d'animaux normotendus, corroboré par méthodes histologiques et biochimiques.^{246,247} Ces changements chez le SHR ont lieu sans que la pression artérielle soit significativement plus élevée. En effet, diverses études *in vitro* ont démontré que le renouvellement cellulaire évalué à partir de l'index de croissance (ratio synthèse d'ADN : apoptose) est beaucoup plus élevé chez les SHR que chez les WKY, privilégiant ainsi l'augmentation de la masse cardiovasculaire et le contenu en ADN chez ces animaux hypertendus.^{374,379,382} Enfin, tout comme l'hypertension essentielle chez l'homme, le SHR démontre des désordres de plusieurs systèmes de régulation de la pression artérielle (voir section 1.1.6.1.).

En résumé, le SHR âgé de onze semaines représente un modèle d'études *in vivo* intéressant d'une part car le remodelage pathologique est bien défini et d'autre part, car le remodelage thérapeutique avec les bloqueurs du SRA est rapide, permettant l'étude approfondie des mécanismes moléculaires et cellulaires généraux responsables de la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire.

5.2. OBJECTIF 1

Identification du type cellulaire apoptotique lors de la régression de l'hypertrophie cardiaque induit par les bloqueurs du SRA.

Tel que nous l'avons décrit dans l'introduction, les évidences actuelles suggèrent que la régulation de l'apoptose dans le coeur par l'AngII est cellule spécifique (section 1.3.4.3.). Ce même signal peut induire via l'activation des récepteurs AT₁ l'apoptose des cardiomyocytes d'une part^{255,383} ce qui compromet la

fonction cardiaque,^{328,331,384} ainsi que la prolifération des fibroblastes,³⁸⁵ ce qui augmente le dépôt de la matrice extracellulaire pouvant engendrer la fibrose cardiaque.^{386,387} Ces deux phénomènes sont atténués avec les iECA ou des antagonistes AT₁, ce qui démontre la capacité cardioprotectrice des bloqueurs du SRA.^{328,375,384,388} Donc la question clé de la première étude était de savoir si l'hyperplasie pré-établie des fibroblastes peut être renversé par apoptose avec les bloqueurs du SRA; une hypothèse que nous avons confirmé par analyses biochimiques, histologiques et stéréologiques.

Avec un peu de recul sur nos résultats, nous avons observé que les deux traitements antihypertenseurs (antagoniste AT₁, iECA) possèdent:

- 1) un effet pro-apoptotique sur le même type cellulaire (fibroblastes),
- 2) une amplitude identique de l'effet pro-apoptotique,
- 3) une proportion identique de la diminution de la cellularité des non-cardiomyocytes (le nombre total de non-cardiomyocytes des SHR après traitement est équivalent à celui des WKY non-traités du même âge),
- 4) aucun changement dans la cellularité des cardiomyocytes ou la densité capillaire.

Cependant, confirmant les résultats antérieurs obtenus par notre groupe, nous avons observé une divergence dans la cinétique d'induction de l'apoptose avec les deux médicaments (l'apoptose est stimulée à 1 semaine avec les antagonistes AT₁ comparativement à 2 semaines pour une dose équipotente d'iECA). Dans leur ensemble, ces résultats peuvent suggérer que les bloqueurs du SRA stimulent l'apoptose dans une sous-population de fibroblaste. De plus, nous avons observé un « gradient » de fibroblastes apoptotiques dans la paroi ventriculaire avec des taux élevés dans la région épicaudique et subépicaudique, diminuant progressivement de la région du midmyocarde vers l'endocarde. Ceci appuie la suggestion d'une hétérogénéité des phénotypes des cardiocytes à travers la paroi

ventriculaire, supportant l'idée d'une induction de l'apoptose selon une sous-population ou l'environnement cellulaire.

5.2.1. Susceptibilité d'une sous-population cellulaire à l'apoptose

5.2.1.1. Myofibroblastes et cellules mésothéliales

Il est connu que le stress exercé sur la paroi ventriculaire cause un changement du phénotype des fibroblastes en myofibroblastes.¹²⁷ Les myofibroblastes possèdent un phénotype contractile grâce à l'expression de plusieurs marqueurs de CML tel α -actine CML, la tropomyosine et la chaîne lourde-B de la myosine.^{389,390} La production accentuée de cytokines, chémokines, protéases et protéines matricielles de ce sous-type de fibroblaste^{127,389} joue un rôle crucial dans la pathologie, l'inflammation, la fibrose cardiaque et lors du processus de réparation. Leur expression augmentée en collagène de type I précède la formation du tissu fibreux¹²⁸ suite à une ligation coronaire, pericardiotomie, ou lors de la défaillance cardiaque.

L'activation chronique du SRA et de l'axe aldostérone est associée au remodelage structurel pathologique des ventricules caractérisé par la fibrose réparative (e.g. cicatrices microscopiques) et réactive (périvasculaire/interstitiel) due à la prolifération des fibroblastes et des myofibroblastes.³⁹¹ En fait, l'aldostérone augmente directement la prolifération des myofibroblastes via le récepteur aux minéralocorticoïdes par un mécanisme dépendant de l'activation de la voie de Ki-RasA et la cascade MAPK1/2.³⁹² De leur part, ces myofibroblastes expriment l'ECA et produisent de l'AngII localement ce qui régule la synthèse du collagène de manière autocrine/paracrine et médie la réponse fibrotique, entre-autre celle de l'épicarde.^{393,394} De plus, des études dans des fibroblastes cardiaques de rat en culture ont démontré l'expression de l'ECA induit par le TGF- β 1 est associé à son tour à la différenciation de ces cellules en myofibroblastes et à la fibrose

cardiaque.^{395,396} L'ensemble de ces composantes décrites ci-haut aurait un effet potentialisateur sur la différenciation. Compte tenu que l'hypertension artérielle représente un facteur de risque pour les complications fibrotiques et elle est associée à une augmentation de l'expression de l'ECA tissulaire, ceci pourrait représenter une contribution additionnelle à la différenciation de fibroblastes cardiaques en myofibroblastes. Finalement, compte tenu des fonctions exercées par les myofibroblastes, ceux-ci doivent posséder à la fois une capacité de migration (phénotype contractile) ainsi qu'une grande capacité proliférative et d'élaboration de composantes de la matrice extracellulaire responsable de la fibrose/cicatrisation (phénotype synthétique). Ceci sous-entend que ce sous-type de fibroblaste possède une capacité accrue à modifier son phénotype et donc à se dédifférencier.

Un autre type cellulaire cardiaque possédant une grande capacité proliférative et donc apoptotique (renouvellement « turnover » élevé) est la cellule mésothéliale de l'épicaire faisant partie intégrante de la plèvre cardiaque. Les cellules mésothéliales contribuent grandement à l'expression tissulaire de metalloprotéases matriciels et d'AngII. Cette génération locale régule aussi de manière autocrine/paracrine la synthèse et la déposition de collagène du type I des fibroblastes avoisinants.⁹⁵ De même, les cellules mésothéliales modulent le phénotype des myocytes en co-culture en augmentant leur expression en α -actine CML.¹²⁹ Dans de telles conditions, une réponse similaire dans les fibroblastes supporterait l'idée d'une prévalence de myofibroblastes dans la région épicaire et subépicaire, ce qui représente une hypothèse intéressante pouvant expliquer la fibrose péricardique associée aux stades avancés de l'hypertrophie et à la défaillance cardiaque. La modulation phénotypique n'est pas un phénomène isolé. En fait, un changement phénotypique a été décrit dans les CML vasculaires qui substituent leur phénotype contractile pour un phénotype synthétique ; un prérequis pour la progression de la maladie vasculaire.³⁹⁷

D'autre part, il est intéressant de noter que l'AngII induit l'apoptose dans les CML vasculaires en culture selon leur phénotype³⁹⁸ démontrant une susceptibilité à l'apoptose selon le phénotype d'une sous-population cellulaire.

Nous avons observé d'une part que les niveaux d'apoptose basale et stimulé sont les plus élevés dans les cellules mésothéliales de l'épicaide et d'autre part, que l'apoptose du myocarde est préférentiellement localisée dans la région sub-épicaide du ventricule. Ainsi il serait intéressant de spéculer que les niveaux élevés de l'apoptose dans le subépicaide comparativement du reste du myocarde est stimulé préférentiellement dans des fibroblastes transformés en myofibroblastes. Cette hypothèse est intéressante vu la grande capacité de renouvellement de cette sous-population cellulaire, tout comme les cellules mésothéliales, conférant de ce fait même une sensibilité accrue à la mort, ainsi que leur localisation adjacente aux cellules mésothéliales et de leur influence paracrine de la modulation phénotypique accentuant potentiellement cet effet. Si confirmé, ceci pourrait avoir des implications importantes dans l'élaboration de nouvelles thérapies sélectives ayant pour but la régression des désordres fibrotiques. En tous les cas, une distribution en gradient depuis l'épicaide de cette sous-population de fibroblaste dans l'hypertrophie cardiaque pourrait être vérifié par un marquage immunohistologique de l' α -actine CML, et l'implication de ce sous-type de fibroblaste dans l'induction de l'apoptose par les inhibiteurs du SRA pourrait être vérifié avec un co-marquage TUNEL - α -actine CML. Finalement, il est intrigant de spéculer que l'apoptose dans les cellules épicaïques et sub-épicaïques durant la régression de l'hypertrophie cardiaque puisse aider à préserver la fonction cardiaque en diminuant l'épaisseur de la paroi ventriculaire sans augmenter la cavité ventriculaire.

5.2.1.2. Cellules polyploïdes

L'hypertrophie cardiaque est caractérisée par le développement de polyploïdie ; une preuve additionnelle de l'hétérogénéité de sous-populations cellulaire dans la pathologie. Il a été démontré *in vitro* et *in vivo* que les cellules polyploïdes aortiques et cardiaques sont plus fréquents chez les SHR que chez les WKY. De plus, les cellules polyploïdes sont plus susceptibles que les cellules diploïdes à entrer en apoptose. Dans cette première étude, les deux classes d'antihypertenseurs ont démontré une tendance à augmenter le marquage TUNEL dans les cardiomyocytes ; un effet qui est d'ailleurs significatif avec l'énalapril. L'effet cumulatif était cependant marginal car le nombre total de cardiomyocytes dans le ventricule n'a pas changé après 4 semaines de traitement. Diez et al. ont rapporté que l'administration du quinapril a diminué le pourcentage de cardiomyocytes tetraploïdes chez le SHR durant les 14 semaines de traitement.²⁴⁷ Ces données suggèrent soit une division nucléaire ou soulèvent la possibilité que les inhibiteurs de la voie de l'angiotensine puissent induire l'apoptose des cardiomyocytes polyploïdes de façon précoce durant le traitement du SHR.

Un déficit ou aberration de la protéine p53 induit la polyploïdie dans des fibroblastes de souris et d'humain.³⁹⁹ Ainsi, p53 aide à maintenir la ploïdie normale en prévenant la réplication de l'ADN avant la division mitotique cellulaire. Actuellement, il y a peu de données qui démontrent une existence ou une incidence élevée de fibroblastes polyploïdes dans le système cardiovasculaire dans l'hypertension. Dans la première étude de cette thèse, nous avons observé une diminution de 37% de la cellularité totale des non-cardiomyocytes après 4 semaines de traitement avec les inhibiteurs du SRA ; un résultat qui concorde avec les valeurs obtenues pour la réduction du contenu en ADN après 2 et 4 semaines de traitement.⁴⁰⁰ Ainsi, compte tenu de la similarité des valeurs de la réduction de la cellularité et du contenu en ADN et aussi compte tenu de la grande

proportion dans la réduction des non-cardiomyocytes totales chez les SHR traités, on peut a priori écarter une contribution majeure de fibroblastes polyploïdes dans la réponse apoptotique. Cependant, il est connu que le remodelage cardiovasculaire et l'hypertrophie des organes cibles dans l'hypertension est causée par la mutation de gènes de régulation du cycle cellulaire ou de l'apoptose dont p53. Une centaine de tels gènes sont impliqués dans le contrôle de la survie cellulaire dans la pathogénèse de l'hypertension et la liste ne cesse de grandir.⁴⁰¹ Une divergence génotypique dans une sous-population cellulaire pourrait être associée à une sensibilité accrue d'une sous-population cellulaire à l'apoptose thérapeutique.

5.2.2. Susceptibilité à l'apoptose selon l'environnement

Une hétérogénéité due à l'environnement local, autre que l'influence du mésothélium, pourrait être responsable du gradient d'apoptose des fibroblastes. En fait, une hétérogénéité du phénotype des cardiomyocytes a déjà été documenté. Les cardiomyocytes subépicaux et subendocardiaux diffèrent en terme de concentration intracellulaire d'ions libres^{402,403} d'expression des récepteurs et de cinétique dans l'activité de canaux ioniques⁴⁰⁴⁻⁴⁰⁷ qui est d'ailleurs maintenue *in vitro*. Plusieurs études ont documenté un gradient transmural négatif au cours des raccourcissements et des étirements des cardiomyocytes du subendocarde au subépicaire.^{408,409} Aussi, les cardiomyocytes du subendocarde ont une consommation métabolique plus élevée que les cardiomyocytes de l'épicaire. Fortuno et al. ont démontré chez des SHR âgés de 16 semaines une incidence plus élevée de l'apoptose des cardiomyocytes dans le subendocarde et le mésocarde et une réduction de l'apoptose des cardiomyocytes dans ces régions par le losartan sans pourtant affecter l'apoptose subépicaire après 14 semaines de traitement versus les témoins.²⁴⁹ Compte tenu la régulation paracrine de la croissance cellulaire entre les fibroblastes et les cardiomyocytes,⁴¹⁰ on peut spéculer qu'à l'inverse, l'hétérogénéité des

cardiomyocytes puisse conférer une sensibilité différente aux cellules avoisinantes dans l'intégration du signal apoptotique. Ainsi, des études supplémentaires seront requises pour déterminer les mécanismes expliquant la distribution « en gradient » des cellules apoptotiques dans le coeur en régression rapide en réponse à une thérapie antihypertensive.

5.2.2.1. Rôle de la matrice extracellulaire

Les effets bénéfiques des bloqueurs du SRA incluent la résorption de la matrice extracellulaire par des mécanismes impliquant à la fois une diminution de sa synthèse et une augmentation de l'activité des MMP.²⁷⁴ Le détachement des cellules de la matrice suite à des changements dans sa composition est associé à une perturbation de l'interaction avec les intégrines, ce qui peut engendrer une stimulation de la réponse apoptotique nommé dans ce contexte *anoikis*. L'hypothèse mécanistique de l'anoikis apparaît être l'augmentation de l'expression de FasL, l'atténuation de l'activité ERK1/2 et Akt/PKB^{411,412} ainsi que le recrutement et l'activation de la caspase 8 par les intégrines dissociées de la matrice extracellulaire.⁴¹³

Nos études ont démontré une résorption du contenu relatif en collagène avec l'énalapril et une diminution du contenu absolu d'élastine avec le valsartan et l'énalapril dans le ventricule gauche de SHR traités pendant 4 semaines (résultats non-publiés). De plus, nous avons démontré que ces mêmes traitements réduisent l'aire de section ainsi que la largeur de la paroi ventriculaire gauche, sans pour autant affecter les dimensions des cavités ventriculaires. Ceci suggère que la résorption de la paroi ventriculaire, qui pourrait être au moins en partie due à une réduction des composantes de la matrice, est plus grande dans la région épicaudique et sub-épicaudique du coeur que partout ailleurs dans le ventricule. De même, l'apoptose stimulée par nos traitements est maximale dans ces régions du myocarde. Dans leur ensemble, ces observations pourraient suggérer l'implication

du phénomène d'anoikis, ou alternativement le remodelage de la matrice extracellulaire serait la conséquence de la perte des cellules. Dans ce contexte, il serait intéressant d'évaluer le rôle de la matrice au cours de la phase précoce de la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire dans notre modèle, en mesurant l'expression et l'activité des MMP dans l'aorte et le cœur. De plus, des études d'inhibition des MMP permettraient de mettre en évidence si les cellules meurent par apoptose ou anoikis.

5.2.3. Effets bénéfiques spécifiques au type cellulaire des bloqueurs du SRA

Au cours de la dernière décennie, l'apoptose est apparue comme un déterminant majeur des dommages aux organes cibles associées aux maladies cardiovasculaires. À ce sujet, chez le SHR âgé de plus de 20 semaines, on observe déjà une augmentation de l'incidence de l'apoptose dans les cardiomyocytes et de la fibrose cardiaque. Par contre, l'augmentation sélective de l'apoptose des cardiomyocytes peut être réduite par des inhibiteurs de la voie de l'AngII administrés sur une période approximative de 14 semaines chez les animaux âgés entre 16 et 30 semaines indépendamment de la diminution de la pression artérielle.^{247,249,384} De ce fait, l'inhibition du SRA représente un traitement préventif au développement de l'insuffisance cardiaque chez les SHR âgés. Par ailleurs, notre groupe a rapporté une réponse inverse en apparence, soit une augmentation de l'apoptose lors de la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire chez le SHR au cours des premières semaines de traitement avec les iECA et les antagonistes AT₁.²⁴⁸ La première étude de cette thèse a démontré que l'apoptose dans ce modèle est augmentée de façon transitoire sélectivement dans les fibroblastes cardiaques interstitiels. Tout comme les résultats obtenus sur la réduction de l'incidence de l'apoptose dans les cardiomyocytes, l'induction de l'apoptose par ces agents antihypertenseurs ne semble pas être une conséquence directe de la normalisation de la pression. En effet, chez le SHR, la réduction de la pression artérielle entraînée par un traitement de quatre semaines avec le

vasodilatateur direct l'hydralazine n'est pas associée à des modulations de l'apoptose, de la prolifération ou de l'hypertrophie cardiovasculaire. On ne peut toutefois ignorer le fait que l'apoptose est stimulée uniquement dans le ventricule gauche et non dans le ventricule droit avec les bloqueurs du SRA, ce qui pourrait suggérer une contribution de la normalisation de la pression. Cependant, dans l'ensemble, on peut considérer que la pression joue un rôle permissif mais non-suffisant dans l'apoptose cardiovasculaire durant le remodelage thérapeutique. D'autre part, ces études ont démontré que la fenêtre apoptotique précède à la fois la réduction soutenue de la synthèse d'ADN et la réduction de la masse cardiovasculaire, ce qui suggère que l'induction de l'apoptose est dissocié dans le temps de l'inhibition de la prolifération cellulaire et représente un des premiers d'une séquence d'événements entraînant la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire.

L'ensemble de ces données démontrent que des agents appartenant à des mêmes classes entraînent des effets opposés sur l'apoptose cardiaque en fonction du temps (inhibition de l'apoptose des cardiomyocytes à long terme, induction précoce de l'apoptose des fibroblastes) et indépendamment de la normalisation de la pression sanguine. Tel que discuté dans l'introduction, l'ensemble des données dans la littérature démontre que l'activation du récepteur AT_1 stimule la prolifération des fibroblastes et des CML alors qu'elle induit l'apoptose dans les cardiomyocytes, et ce fait même nous pouvons conclure que le blocage du signal à l'AngII module des réponses inverses. La diminution du risque de développer la fibrose cardiaque associée aux thérapies antihypertensives reflète possiblement en partie l'induction sélective de l'apoptose dans les fibroblastes, alors que la préservation de la fonction cardiaque avec la pharmacothérapie reflète probablement l'inhibition de l'apoptose des cardiomyocytes. Ces données démontrent que l'apoptose cardiaque chez le SHR contribue aux effets bénéfiques des inhibiteurs de la voie de l'AngII et que sa régulation est à la fois d'ordre temporel et spécifique au type cellulaire.

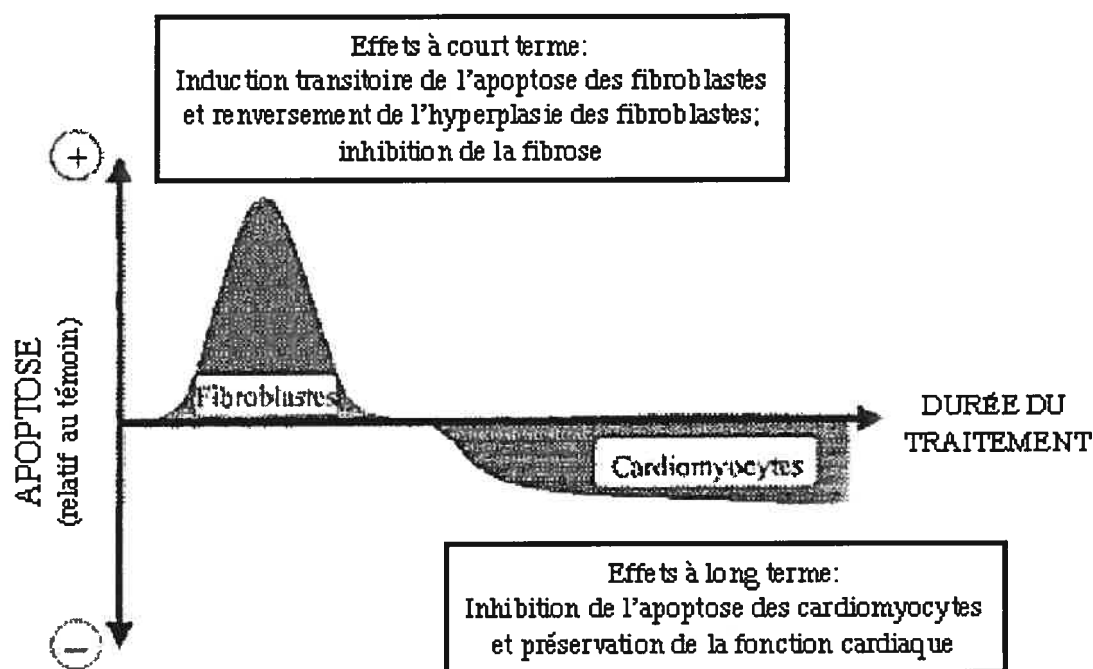


Figure 8 : Représentation schématique de la régulation d'ordre temporel et spécifique au type cellulaire de l'apoptose induit par les bloqueurs du SRA.²⁵³

5.3. OBJECTIF 2

Détermination du rôle des récepteurs AT_2 dans l'apoptose induit par les bloqueurs du SRA lors de la régression de l'hypertrophie cardiaque.

L'AngII est un régulateur clé de l'homéostasie cardiovasculaire. Tel que décrit dans l'introduction, l'AngII provoque des effets opposés dépendamment du sous-type de récepteur sur lequel il se lie. En agissant sur le récepteur AT_1 , l'AngII stimule la majorité des effets presseurs et trophiques tandis qu'en agissant sur le

récepteur AT_2 , ce même médiateur stimule des effets pro-apoptotiques et anti-prolifératives. Cependant, le rôle du récepteur AT_2 *in vivo* n'est pas entièrement élucidé. Il est à savoir que les récepteurs AT_2 augmentent dans la pathologie par exemple durant l'hypertrophie cardiovasculaire,⁴¹⁴ en même temps que les récepteurs AT_1 sont sous-exprimés¹⁹⁸. Cette modulation des récepteurs nous indique l'importance de leur caractérisation dans la pathologie et la détermination de leur fonction durant le traitement.

Dans la première étude de la thèse, nous avons reconfirmé par la méthode TUNEL les résultats antérieurs provenant de notre groupe. Nos résultats ont démontré que l'apoptose stimulée durant la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire par les antagonistes AT_1 nécessite 1 semaine de traitement, versus 2 semaines pour le traitement avec les iECA. Considérant que les antagonistes AT_1 causent une augmentation de l'AngII circulante pouvant surstimuler les récepteurs AT_2 pro-apoptotiques,^{415,416} et considérant que AT_2 joue un rôle dans la régression et l'apoptose dans l'aorte (voir annexe), nous avons vérifié l'implication du récepteur AT_2 dans la réponse apoptotique cardiaque stimulée par l'antagoniste AT_1 , le valsartan et l'iECA, l'énalapril.

Une semaine de traitement au valsartan a induit une augmentation de l'apoptose des cellules mésothéliales de l'épicarde, un effet bloqué par la co-administration du PD123319 suggérant l'implication du récepteur AT_2 dans cette réponse, dont l'expression a été confirmée par RT-PCR. Aussi, valsartan a induit l'apoptose dans les fibroblastes interstitiels mais de façon AT_2 indépendante. D'autre part, 2 semaines de traitement à l'énalapril a induit l'apoptose dans ces mêmes types cellulaires de façon AT_2 indépendante. Ces résultats démontrent que les récepteurs AT_2 stimulent un effet pro-apoptotique cardiocyte-spécifique *in vivo* durant le blocage du récepteur AT_1 mais pas durant l'inhibition de l'ECA.

La différence dans la cinétique d'induction de l'apoptose pourrait s'expliquer par la nature du blocage même du signal de l'AngII. En fait, avec le blocage direct du récepteur AT_1 et la surstimulation du récepteur pro-apoptotique AT_2 , valsartan induit un signal apoptotique rapide. Pour vérifier l'importance de la surstimulation du récepteur AT_2 dans la réponse apoptotique induite par les antagonistes AT_1 , il serait intéressant d'adapter notre modèle avec une approche de thérapie génique (voir section 1.1.5.4.) et d'évaluer l'apoptose cardiovasculaire selon nos protocoles usuels. En fait, un antisens dirigé contre le récepteur AT_1 a déjà été utilisé avec succès pour diminuer l'activité AT_1 chez le SHR mais sans augmentation de l'AngII plasmatique.⁴¹⁷ D'autre part, enalapril bloque l'ECA, mais due au fait que plusieurs autres enzymes peuvent prendre la relève catalytique, un signal résultant d'AngII pourrait maintenir un signal de survie et de ce fait même retarder la mort cellulaire. Ceci pourrait être vérifié en co-traitant avec un antagoniste AT_1 pour voir si le temps requis pour induire l'apoptose avec enalapril serait devancé. Cependant, cette hypothèse est peu probable due à la constatation que la diminution du signal aux récepteurs AT_1 et AT_2 de l'AngII avec 2 semaines de traitement à l'enalapril induit une réponse apoptotique, tandis qu'une diminution du signal aux récepteurs avec la co-administration du valsartan et du PD123319 pendant 1-2 semaines n'induit pas de réponse apoptotique. Ceci suggère que l'apoptose induite par l'enalapril implique une voie alternative de signalisation. Les mécanismes possibles pour les iECA comprennent les kinines et la correction de la dysfonction endothéliale qui sera vue à la section suivante.

Un autre aspect à considérer ce sont les évidences qui démontrent l'importance du point de vue physiologique et pathophysiologiques des fragments de l'AngII. En effet, le fragment Ang(1-7) est un peptide bioactif du SRA qui peut être même formé indépendamment de l'activité de l'ECA.⁴¹⁸ Ang(1-7) oppose les actions de l'AngII par la stimulation du NO et des prostaglandines vasodilatatrices⁴¹⁹ et des évidences démontrent que Ang(1-7) peut potentialiser les effets

vasodilatatrices de la BK dans des coronaires de chien⁴²⁰ et l'effet hypotenseur de la BK chez des rats normotendus⁴²¹ et hypertendus.⁴²² En plus de ces effets potentialisateurs, l'Ang(1-7) inhibe la croissance vasculaire et atténue la vasoconstriction induite par l'AngII. De ce fait, ce fragment est impliqué dans la médiation d'effets similaires à ceux du récepteur AT₂ tel que la vasodilatation et la réduction de la croissance. Ainsi, il est intéressant de spéculer l'implication, au moins en partie, de l'Ang(1-7) dans l'effet pro-apoptotique AT₂-indépendante des fibroblastes cardiaques observé dans nos études, d'autant plus car le traitement avec les iECA et les antagonistes AT₁ sont associés avec une augmentation d'Ang(1-7). Ceci pourrait toutefois être vérifié à l'aide de l'antagoniste A-779 du fragment.

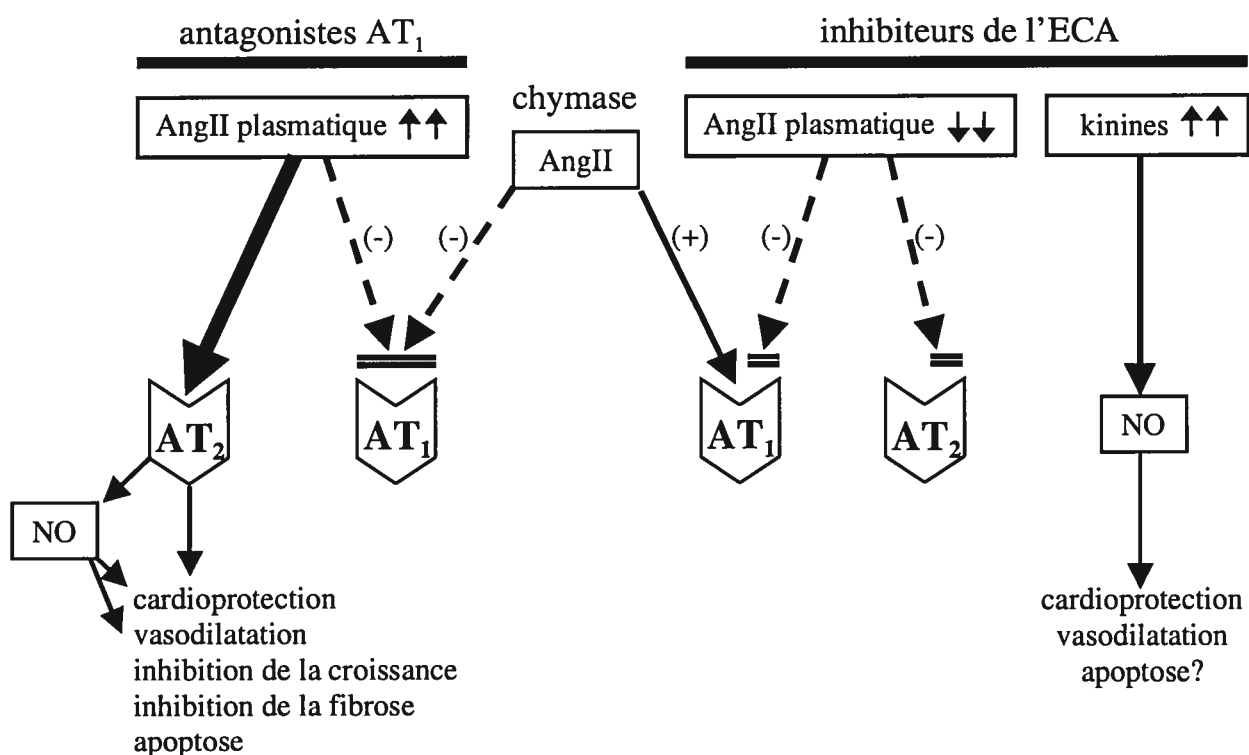


Figure 9 : Comparaison entre les actions pharmacologiques potentielles des antagonistes AT₁ et des iECA et des voies moléculaires impliquées.

5.4. OBJECTIF 3

Détermination de l'implication de la correction de la dysfonction endothéliale dans l'apoptose induit par les iECA lors de la régression de l'hypertrophie vasculaire.

Dans la première étude de la thèse, nous avons identifié les types de cardiocytes entrant en apoptose au cours de la phase précoce du traitement aux bloqueurs du SRA. Dans la deuxième étude, nous avons fourni des données suggérant l'implication du récepteur AT₂ cardiaque dans cette réponse chez des SHR traités pour une semaine avec le valsartan mais pas avec le traitement de 2 semaines avec l'énalapril. De même, une autre étude provenant de notre laboratoire auquel j'ai contribué a précédemment confirmé l'implication du récepteur AT₂ dans l'apoptose des CML de l'aorte induit par le valsartan mais pas par l'énalapril dans notre modèle (voir annexe). Ainsi, dans la troisième étude, nous avons donc voulu élucider les déterminants de la stimulation de l'apoptose avec les iECA dans les CML vasculaires.

L'hypertension essentielle est associée à la dysfonction de la NO synthase qui implique une augmentation de la production de ROS et une réduction du NO. De même il a été démontré que les ROS tel O₂⁻ augmentent la croissance cellulaire ou la survie dans les cellules endothéliales et les fibroblastes^{294,298} tandis que le NO a un effet opposé et induit l'apoptose dans ces mêmes cellules.³⁰¹⁻³⁰⁴ Ainsi, la balance ROS/NO est un constituant majeur de la balance prolifération/apoptose. La dysfonction endothéliale est corrigée suite au traitement avec des bloqueurs du SRA¹⁹¹⁻¹⁹³ mais pas l'hydralazine¹⁹⁴ et l'augmentation de la biodisponibilité du NO est associée à la régression de l'hypertrophie vasculaire.^{423,424} De plus, il a été démontré que ces mêmes bloqueurs du SRA peuvent induire l'apoptose cardiovasculaire. Ainsi, nous avons

vérifié dans la troisième étude l'importance de la correction de la dysfonction endothéliale dans la réponse pro-apoptotique de l'enalapril.

Nous avons observé que la dysfonction endothéliale est corrigée après 2 semaines de traitement avec l'enalapril ; un effet qui concorde dans le temps avec l'induction de l'apoptose cardiovasculaire. L'accélération de la correction de la dysfonction endothéliale à une semaine à l'aide d'une thérapie mixte L-arginine+BH₄ n'a pas d'effet à elle seule sur l'induction de l'apoptose vasculaire, cependant ce traitement augmente de façon synergique l'effet pro-apoptotique de l'enalapril à une semaine de traitement. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que *la correction de la dysfonction endothéliale représente une constituante de l'effet thérapeutique de l'enalapril qui est non suffisante en soi mais qui pourrait néanmoins être permissive pour stimuler l'apoptose.*

Tel que nous avons décrit précédemment, la diminution du signal aux récepteurs de l'AngII avec l'enalapril induit une réponse apoptotique, tandis que le co-traitement valsartan + PD123319 ne fournit aucune réponse. Cette constatation en plus de la nécessité d'une fonction endothéliale normalisée chez le SHR (par L-arginine+BH₄ et/ou diminution du stress oxydatif par atténuation du signal AT₁) suggère que *l'apoptose induite par l'enalapril requiert une voie supplémentaire de signalisation* qui implique une fonction eNOS optimale pour pouvoir générer un effet synergique sur l'apoptose

L'implication de la voie kinine/NO dans notre modèle est un candidat intéressant répondant à ces critères.

En plus de diminuer le signal aux deux sous-types de récepteurs, l'iECA diminue la dégradation des kinines⁴²⁵ une classe de peptides qui engendrent la stimulation des cellules endothéliales via les récepteur B2 (constitutifs) ou B1 (inductibles) dans la production du NO; un puissant stimulant apoptotique.⁴²⁶ Ceci laisse à

élevés des kinines activant subséquemment la relâche du NO et activant la voie cGMP. En fait, certaines études suggèrent que l'activation de la voie kinine/NO réduit la masse cardiovasculaire durant l'inhibition de l'ECA⁴²⁷⁻⁴²⁹ ou suite à l'administration d'un plasmide contenant le gène de la kallikréine humaine (h-kallikréine; enzyme générant les kinines). Or, tel que nous l'avons mentionné, l'efficacité des kinines est probablement réduite dans l'induction de l'apoptose et la régression de la masse cardiovasculaire due à la dysfonction de la NO synthase chez le SHR. Cependant, à l'aide de notre modèle et nos traitements rétablissant la fonction endothéliale, nous sommes en position unique afin de vérifier la contribution de la voie kinines/NO aux effets pro-apoptotiques et anti-prolifératives des iECA.

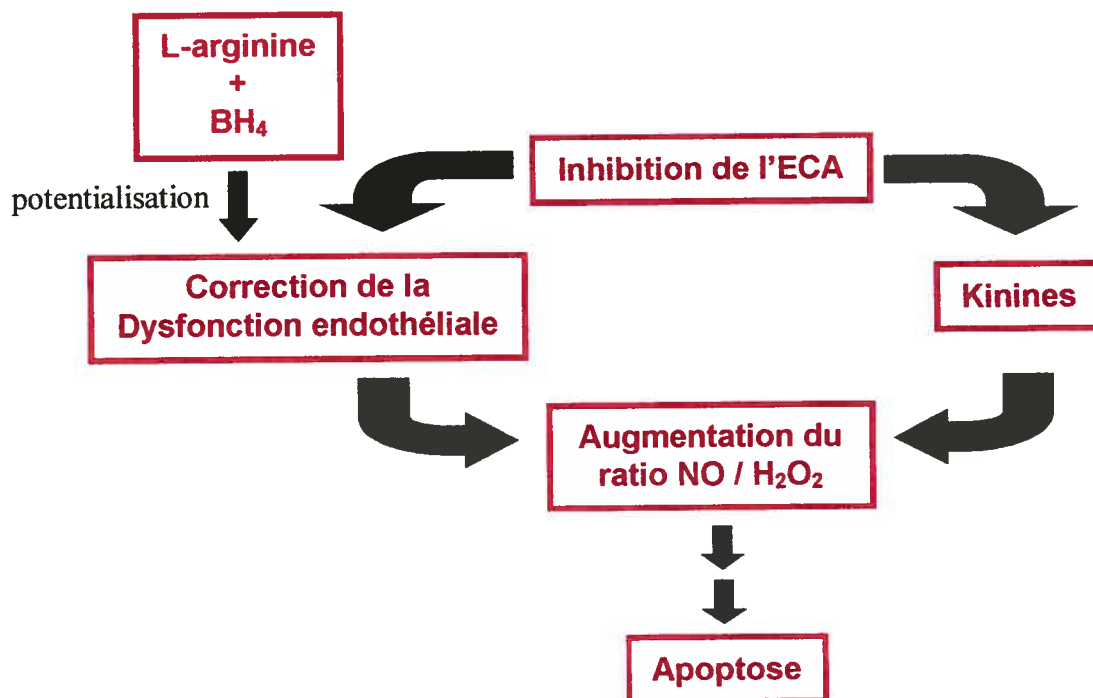


Figure 10 : Représentation schématique de l'hypothèse de l'effet thérapeutique de l'énalapril sur la structure vasculaire.

Dans une étude provenant de notre groupe et à laquelle j'ai collaboré, nous avons étudié le rôle du récepteur B2 dans l'apoptose des CML durant la régression de l'hypertrophie aortique chez des SHR traités avec l'énalapril. Nous avons

Dans une étude provenant de notre groupe et à laquelle j'ai collaboré, nous avons étudié le rôle du récepteur B2 dans l'apoptose des CML durant la régression de l'hypertrophie aortique chez des SHR traités avec l'enalapril. Nous avons démontré que l'induction de l'apoptose et la régression de l'hypertrophie induit par 4 semaines de traitement avec l'enalapril n'est pas atténuée par un blocage efficace du récepteur B2 à l'aide de l'antagoniste spécifique HOE 140 (Duguay et al., non-publié). Ainsi, le récepteur B2 des kinines ne serait pas directement impliqué dans la régression de l'hypertrophie vasculaire induit par l'enalapril.

Contrairement au récepteur B2 qui est exprimé abondamment dans plusieurs tissus et médie la plupart des actions physiologiques des kinines, le récepteur B1 des kinines est inductible puis exprimé généralement dans les conditions pathologiques et dans l'inflammation⁴³⁰. Le récepteur B1 demeure un candidat plausible pour les actions pro-apoptotiques de l'enalapril. En fait, des nouvelles actions des iECA ont été récemment décrites soit l'induction du récepteur B1 des kinines durant le traitement de rats normotendus⁴³¹ et étonnamment la stimulation directe du récepteur B1 par les iECA tel l'enalaprilat.^{432,433} Ainsi, de nouvelles études devront démontrer l'implication du récepteur B1 dans l'apoptose cardiovasculaire stimulée par les iECA dans notre modèle en utilisant des antagonistes appropriés ciblant les récepteurs B1. Alternativement, la confection et l'administration d'antisenses pour les 2 sous types de récepteurs en plus du traitement avec l'iECA pourrait nous fournir des informations à ce sujet. D'autre part, afin de cibler plus étroitement la voie des kinines/NO, c'est-à-dire d'augmenter les niveaux des kinines sans impliquer le SRA, on pourrait examiner les effets du transfert du gène de la kallikreine chez le SHR.^{434,435} Le plasmide contenant le gène pourrait être administré seul ou en combinaison avec les différents antagonistes des sous-types de récepteurs aux kinines, et d'autre part avec L-NAME ou la thérapie stimulant le NO afin de mettre en cause la synthèse du NO et la correction de la dysfonction endothéliale respectivement.

5.5. PERSPECTIVES ET DIRECTIONS FUTURES

5.5.1. Sous-populations cellulaires apoptotiques

Une découverte importante de ce projet de doctorat est l'identification des types cellulaires apoptotiques induits par la thérapie antihypertensive lors de la régression de l'hypertrophie cardiaque. Nous avons identifié les fibroblastes interstitiels du ventricule gauche comme étant la cible primaire de l'action des bloqueurs du SRA et nous avons émis comme hypothèse dans la discussion une sous-population de fibroblastes privilégiés à cet effet. Cette hypothèse pourrait être confirmée par des traitements intermittents en alternant diverses classes d'antihypertenseurs. En effet, l'apoptose pourrait être stimulée par un premier traitement et suite à une « vacance thérapeutique » on tentera de re-stimuler l'apoptose avec un médicament d'une différente classe d'antihypertenseur. Nous pourrions faire une série d'expériences en utilisant différents groupes d'animaux où l'ordre des traitements ainsi que les médicaments administrés seront alternés. Après chaque protocole de traitement intermittent, la non-efficacité du second traitement dans l'induction de l'apoptose des fibroblastes pourrait refléter une élimination sélective d'une sous-population plus susceptibles à la mort dès le premier traitement, ou une adaptation pharmacologique des cellules à un nouvel environnement (voir section 5.2.2.). En revanche, si le deuxième traitement induit une seconde vague d'apoptose, nous pourrions réfuter l'hypothèse d'une sous-population cellulaire privilégiée dans la réponse apoptotique. De plus, nous pourrions suivre le patron changeant de la population cellulaire dans les tissus cardiovasculaires avant, pendant et après les traitements en combinant les informations obtenues par les analyses de l'expression des gènes avec la technologie des micropuces d'ADN (DNA microarrays) et en protéomique. À cause de la complexité des organes comme le cœur qui est dû à la multiplicité des types cellulaires, l'étude des sous-populations de fibroblastes pourrait être complétée par l'analyse des cellules en culture. Vu que l'isolation et la mise en culture même des cellules induit l'apoptose, il serait intéressant de traiter les

cellules avec l'inhibiteur général irréversible des caspases z-VAD-fmk⁴³⁶ afin de préserver toutes les sous-populations cellulaires et surtout celles qui possèdent une plus grande tendance à entrer en apoptose.

Autre que l'hypothèse d'une sous-population privilégiée à la réponse apoptotique, il se pourrait qu'un phénomène non encore identifié de « désensibilisation à l'apoptose » ait lieu. En fait, la fermeture de la fenêtre apoptotique et l'incapacité à sa ré-induction pourrait être dû à une résistance des cellules avoisinantes à l'apoptose par une « immunisation » suite à l'ingestion des corps apoptotiques par les cellules viables. Des études ultérieures seront nécessaires pour tester cette hypothèse. Par exemple, à partir d'une culture cellulaire, on pourrait fournir un stimuli apoptotique en même temps qu'un agent intercalant à l'ADN (i.e. iode de propidium) permettant de marquer uniquement les noyaux apoptotiques. L'ingestion de ces noyaux marqués par les cellules avoisinantes identifiera les cellules susceptibles d'être immunisées. Suite à une ré-induction de l'apoptose par le même stimuli, les cellules entrant en apoptose pourront être identifiées par un second marqueur (i.e. annexine V). Par conséquent, il sera possible de déterminer si les cellules immunisées sont protégées ou aussi susceptibles que les autres à entrer en apoptose.

5.5.2. Contrôle de la fibrose

Dans cette thèse, nous avons émis l'hypothèse que l'apoptose des fibroblastes interstitiels durant la régression de l'hypertrophie cardiaque pourrait potentiellement être responsable de la diminution de la fibrose cardiaque qui représente un phénomène associé au traitement chronique des bloqueurs du SRA. Ce concept devrait toutefois être vérifié à l'aide de nouvelles études où la fibrose cardiaque pourrait être induit par l'administration du L-NAME chez des SHR ayant préalablement été soumis ou pas à nos protocoles de traitements aigus induisant l'apoptose des fibroblastes. La quantification de la fibrose serait évaluée

par l'amplitude et la densité du dépôt des composantes de la matrice extracellulaire.

Une voie alternative au SRA dans le contrôle de l'hyperplasie des fibroblastes cardiaques et de la fibrose du myocarde est l'inhibiteur naturel de la prolifération des cellules souches hématopoïétiques soit le N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline (Ac-SDKP). Ac-SDKP inhibe la prolifération cellulaire et le dépôt du collagène dans le ventricule de SHR et sa concentration plasmatique est augmentée de 5-fois suite au traitement avec les iECA.⁴³⁷ D'autres études ont démontré que Ac-SDKP prévient le dépôt de collagène et la prolifération cellulaire dans le cœur et le rein chez des rats traités à l'aldostérone.⁴³⁸ De ce fait, il ne faudrait pas négliger l'implication potentielle du Ac-SDKP en tant qu'inhibiteur de la fibrose cardiaque dans notre modèle.

D'autre part, la synthèse de l'aldostérone est modulée par l'action de l'AngII via son récepteur AT₁. En plus de son action sur l'augmentation de la réabsorption du sodium par les tubules rénaux, l'aldostérone favorise la fibrose cardiaque et vasculaire via le récepteur aux minéralocorticoïdes par une synthèse augmentée du collagène des fibroblastes dans divers modèles expérimentaux dont le SHR.⁴³⁹ Il est suggéré que les iECA et les antagonistes AT₁ de l'AngII préviennent l'accumulation du collagène dans les tissus cardiovasculaires au moins en partie par l'atténuation du signal de l'aldostérone.⁴⁴⁰ De plus l'inhibiteur compétitif de l'aldostérone, le spironolactone, prévient la réponse fibrotique cardiaque. D'autre part, des études récentes ont démontré que la stimulation AT₁ par l'AngII induit l'apoptose des cardiomyocytes par un mécanisme impliquant l'aldostérone.⁴⁴¹ Ceci sous-entend le bénéfice potentiel de l'utilisation des antagonistes de l'aldostérone dans la prévention du remodelage pathologique cardiaque. Conséquemment, il serait intéressant de vérifier

l'antagonisme du signal de l'aldostérone en tant que médiateur de l'apoptose des fibroblastes dans notre modèle.

5.5.3. Induction de l'apoptose par le récepteur AT_2

Une forte stimulation des récepteurs AT_2 augmente la synthèse des kininogenases⁴⁴² et de ce fait pourrait être impliqué dans la production des kinines *in vivo*.²⁴² La production de GMP cyclique vasculaire qui est induite par la stimulation du récepteur AT_2 est dépendante du récepteur B2 des kinines. Or les expériences avec le HOE 140 ne supportent pas l'hypothèse d'un rôle pour le récepteur B2 dans la régulation de l'apoptose vasculaire. De plus, l'efficacité de la voie kinine/NO est probablement réduite dans l'induction de l'apoptose et la régression de la masse cardiovasculaire chez le SHR induit par les antagonistes AT_1 vu que la NO synthase est dysfonctionnelle. En fait, il n'y a aucune évidence a priori démontrant que les antagonistes AT_1 corrigent la fonction de cette enzyme dans l'espace d'une semaine de traitement. En revanche, nous avons confirmé la correction de la dysfonction en dedans de 2 semaines de traitement aux iECA. Cependant, l'antagonisme même du récepteur AT_1 pourrait réduire l'activité de la NADPH oxydase et de ce fait diminuer les ROS ayant une activité délétère sur le NO et un effet oxydant sur BH_4 (conversion en BH_2 ⁷⁵). Ceci en plus de la surstimulation du récepteur AT_2 engendrant une activité augmentée de la voie kinine/NO même en présence d'une NOS dysfonctionnelle pourrait être suffisant pour maintenir une activité du NO assez élevée capable d'induire l'apoptose. Des études ultérieures pourraient vérifier l'implication récepteur B2 dans ce modèle en co-administrant HOE 140 avec le traitement aux antagonistes des récepteurs à l'AngII. De plus, d'autres études devraient caractériser la cinétique précoce de la correction de la fonction endothéliale chez des SHR traités avec des antagonistes AT_1 .

D'autre part, parmi les mécanismes de signalisation impliqués dans la survie cellulaire via le récepteur AT_1 (section 1.3.4.1), les voies des tyrosines kinases JNK/SAPK et des MAPK telles que ERK1/2 sont responsables de la médiation du signal hypertrophique dans le coeur. De plus, la voie des PI3Ks joue un rôle important à la fois dans la protection contre l'apoptose, qui semble être médiée par des sérine/thréonine kinases Akt/PKB, et dans la prolifération cellulaire. À ce jour, les études de notre groupe ont démontré que l'apoptose stimulé par l'antagonisme du récepteur AT_1 implique l'activation des caspases synchronisée avec une baisse de l'expression de Bcl-2, et d'autre part que la co-administration de l'antagoniste sélectif du récepteur AT_2 abolit cet effet. Par conséquent, dans la mesure où le récepteur AT_1 agirait en tant que silenceur de AT_2 , on peut spéculer que l'atténuation des voies JNK/SAPK et/ou PI3K puisse contribuer aux effets pro-apoptotiques et anti-polifératifs. Ainsi, des mesures de l'expression de l'activité de ces kinases durant nos traitements antihypertenseurs pourraient apporter de l'information quant à leur implications dans notre modèle. Aussi, il a été démontré que la stimulation du récepteur AT_2 entraîne l'apoptose suite à une atténuation de la voie ERK1/2 via la déphosphorylation de Bcl-2 à travers deux mécanismes possibles soit l'activation des phosphatases MKP-1 ou SHP-1.^{227,229} Ainsi, il serait intéressant d'évaluer l'implication des phosphatases par des études d'inhibition de celles-ci dans notre modèle. Finalement, Il a été démontré que dans les CML, l'activation du récepteur AT_2 par l'AngII entraîne la synthèse *de novo* de céramides qui pourrait jouer un rôle de second messager à la fois dans l'activation de la caspase 3, dans la modulation de la voie JNK et dans l'inactivation de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 entraînant l'augmentation de la susceptibilité des cellules à entrer en apoptose.^{227,256} Par conséquent, il serait intéressant d'évaluer la participation de la voie des ceramides dans notre modèle de régression thérapeutique.

5.6. IMPLICATIONS CLINIQUES

5.6.1. Effets bénéfiques des antagonistes du SRA, nouveaux concepts d'utilisation et considérations cliniques

La multitude d'études cliniques randomisés menés avec les bloqueurs du SRA attestent de leur efficacité sur le point de vue de la protection contre les évènements cardiovasculaires chez des patients hypertendus, défaillants cardiaques, à haut risque d'évènements cardiovasculaires, ayant subi un infarctus, etc. Le Tableau VI détaille plusieurs de ces études.

L'utilisation chronique des bloqueurs du SRA est associée à des effets bénéfiques additionnels à leur effets hypotenseurs. Ces effets bénéfiques sont caractérisés entre-autre par une régression efficace de l'hypertrophie cardiaque et vasculaire, par une prévention des lésions rénales, des AVC, des infarctus, de la dysfonction systolique/diastolique etc. Comme ces effets bénéfiques ne peuvent s'expliquer uniquement par un contrôle plus efficace de la tension artérielle par les bloqueurs du SRA en comparaison à la thérapie conventionnelle, il est permis de postuler que plusieurs de ces bénéfices cliniques soient reliés au blocage de certains effets médiés par l'AngII sur la prolifération des CML et des fibroblastes, sur l'apoptose des cardiomyocytes, et sur le stress oxydatif. Dans ce contexte, nos travaux de doctorat ont permis de démontrer pour la première fois que l'hyperplasie cardiovasculaire pouvait être renversé par l'induction d'une « apoptose thérapeutique » à l'aide de médicaments déjà disponibles en clinique. Cet effet s'est avéré transitoire et ciblé dans des cellules jugés atypiques ou en excès. Cette capacité antiproliférative n'est pas le cas pour toutes les classes d'antihypertenseurs. Des études antérieures provenant de notre laboratoire ont démontré que l'hydralazine est efficace dans la normalisation de la pression mais pas dans l'induction de l'apoptose stimulant la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire tel que font les bloqueurs du SRA. On ignore toutefois les effets potentiels du traitement à long terme de l'hydralazine sur le remodelage.

Tableau VI : Études randomisées avec les bloqueurs du SRA⁴⁴³

ÉTUDE	COMMENTAIRE
(LIFE) ^{444,445} <i>Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension</i>	Losartan est plus efficace que l'aténolol pour évènements cardiovasculaires combinés, les AVC et l'hypertrophie ventriculaire gauche, mais similaire pour l'infarctus du myocarde
(VALUE) ⁴⁴⁶ <i>Valsartan Antihypertensive Long-term Use Evaluation</i>	Compare valsartan et amlodipine dans la prévention d'évènements chez des patients à haut risque. (NC)
(HOPE) ⁴⁴⁷ <i>Heart Outcome Prevention Evaluation</i>	Ramipril réduit les incidences d'AVC, d'infarctus, développement du diabète de 31%, 20% et 30% respectivement versus placebo chez patients déjà contrôlés.
(SOLVD prevention) ⁴⁴⁸ <i>Studies Of Left Ventricular Dysfunction</i>	Enalapril ajouté à la thérapie conventionnelle retarde le développement de la défaillance cardiaque de 37% comparé au placebo et réduit l'hospitalisation chez les patients asymptomatiques.
(SOLVD treatment) ⁴⁴⁹ <i>Studies Of Left Ventricular Dysfunction</i>	Enalapril ajouté à la thérapie conventionnelle réduit de 40% après 1 an la mortalité et l'hospitalisation des patients en défaillance cardiaque due à une dysfonction systolique.
(ELITE II) ⁴⁵⁰ <i>Evaluation of Losartan In The Elderly</i>	Effets similaires du captopril et du losartan sur la mortalité des patients en défaillance cardiaque
(SAVE) ⁴⁵¹ <i>Survival And Ventricular Enlargement</i>	Captopril réduit la morbidité et la mortalité chez des patients avec dysfonction du ventricule gauche.
(AIRE) ⁴⁵² <i>Acute Infarction Ramipril Evaluation</i>	Ramipril donné 3-10 jours post-infarctus chez des patients en défaillance cardiaque réduit la mortalité de 27% versus placebo.
(OPTIMAAL) ⁴⁵³ <i>Optimal Trial In Myocardial Infarction with the Angiotensin Antagonist Losartan</i>	Évalue l'effet du losartan post-infarctus du myocarde. (NC)
(VALIANT) ⁴⁵⁴ <i>VALsartan In Acute myocardial iNfarction Trial</i>	Évalue l'effet du valsartan post-infarctus du myocarde. (NC)

(NC) : non-complété

Enfin, il est à savoir que la diminution de la pression artérielle est un objectif important en clinique, mais la correction des paramètres cardiovasculaires lésés est tout aussi importante (e.g. remodelage, dysfonction endothéliale). Les résultats de ce projet de doctorat militent en faveur d'une reconsidération du rôle relatif de la pression en faveur du remodelage observé dans les organes cibles en cours de thérapie.

Les résultats controversés de l'étude randomisée *Antihypertensive and Lipid Lowering treatment to prevent Heart Attack Trial* (ALLHAT) rendu public récemment ont démontré à partir de 33 357 patients que le diurétique thiazide, la chlorthalidone, est supérieur à l'iECA lisinopril dans la prévention des complications cardiovasculaires majeures tel les AVC et la défaillance cardiaque. De ce fait, le diurétique devrait être prescrit comme thérapie antihypertensive de premier choix.⁴⁵⁵ Ces résultats curieux, de l'avis de plusieurs, pourraient être expliqués par les caractéristiques des patients inclus dans l'étude. En fait, 35% des patients étaient des noirs, chez qui les diurétiques fonctionnent mieux. Ceci pourrait provoquer un biais dans les résultats en donnant plus de poids aux effets des diurétiques comparé aux iECA. Dans la mesure où il est permis d'extrapoler les résultats obtenus expérimentalement de cette thèse à la situation clinique et en faisant le lien avec l'étude ALLHAT, on pourrait spéculer que la chlorthalidone aurait pu à long terme induire le remodelage cardiovasculaire et les effets positifs qui s'y rattachent, quoique ceci reste à démontrer.

Selon les observations de cette thèse et la réalisation de l'importance de renverser les anomalies cellulaires dans le remodelage cardiovasculaire, nous pouvons concevoir de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement de l'hypertension. Un premier traitement aigu (1-2 semaines) avec des bloqueurs du SRA pourrait contribuer à renverser le remodelage cardiovasculaire en stimulant l'apoptose dans les fibroblastes et les CML vasculaires hyperplasiés. De plus, le

co-traitement avec une thérapie stimulant la production du NO tel que nous avons décrit dans cette thèse pourrait potentialiser cet effet pro-apoptotique. De plus, cette normalisation de la structure cardiovasculaire pourrait permettre la diminution soutenue de la pression sanguine. Suite à cette normalisation, et afin de contrer le resurgissement de la haute pression, le patient pourrait recevoir un deuxième traitement chronique avec un diurétique conventionnel peu coûteux (e.g. chlorthalidone) et qui fonctionne tout aussi bien selon l'étude ALLHAT. Ainsi, ce paragraphe décrit la conceptualisation d'un nouveau traitement antihypertenseur à 2 étapes dont nous pouvons en faire une corrélation avec la chimiothérapie antinéoplasique. Le traitement serait donné pendant une courte durée afin d'éliminer les cellules atypiques ou hyperplasiées avec des adjuvants tels que les antioxydants potentialisant les effets pro-apoptotiques et antiprolifératifs et ensuite un second traitement sera donné en chronique afin de maintenir l'homéostasie cardiovasculaire et cellulaire.

L'épicarde, composé de cellules mésothéliales et faisant partie intégrante de la plèvre cardiaque, constitue un site majeur d'expression de l'AngII. La fibrose péricardique post-opératoire de la plèvre cardiaque est associée à une augmentation locale de l'expression de l'ECA puis des récepteurs AT₁. Il a été récemment démontré que le traitement avec le valsartan réduit la fibrose péricardique post-opératoire chez un modèle porcin.⁴⁵⁶ Avec les résultats obtenus dans ce projet de doctorat où nous avons démontré un effet pro-apoptotique massif et transitoire stimulé par le valsartan et l'énalapril dans les cellules mésothéliales de la région épicaudique, il est intéressant de spéculer que ce mécanisme pro-apoptotique même serait à l'origine de la réduction de la fibrose péricardique. Ainsi, de nouvelles études devront vérifier cette hypothèse et si elle est confirmée, nous pourrions envisager des nouveaux traitements post-opératoires en aigus avec les bloqueurs du SRA à titre préventif pour le

développement de désordres fibrotiques du péricarde ou de tout autre désordre du mésothélium, y compris possiblement les mésothéliomes.

Dans ce projet de thèse, nous avons rapporté une hyperplasie des non-cardiomyocytes chez le SHR responsable du remodelage hypertrophique cardiaque. Cette hyperplasie quoiqu'elle pourrait être responsable des complications fibrotiques à long terme pourrait cependant représenter un phénomène compensatoire à la haute pression chronique. Dans ce contexte, son rôle pourrait être de protection contre d'éventuelles insultes cardiaques comme l'ischémie en favorisant une réparation/cicatrisation tissulaire potentialisé. À cet égard, nous avons émis l'hypothèse que les myofibroblastes (fibroblastes responsables en grande partie de la réparation/cicatrisation tissulaire) pourraient constituer la sous-population de cellules ayant proliféré que nous éliminerions par apoptose. Ainsi, une apoptose massive des fibroblastes pourrait avoir un effet négatif en diminuant le potentiel de réparation tissulaire post-infarctus. Compte tenu que l'antagonisme du récepteur AT_1 augmente en plus les niveaux plasmatiques d'AngII, les niveaux élevés de ce facteur de croissance pourraient avoir un effet potentialisant les infarctus. Cependant cette prémisse hypothétique est contrebalancée par le net avantage que procure l'antagonisme du récepteur AT_1 dans la préservation des cardiomyocytes et de la fonction cardiaque en général. En tous les cas, la réponse de la cicatrisation pourrait être vérifiée suite à une occlusion de coronaires chez des SHR prétraités ou pas selon nos protocoles usuels avec les inhibiteurs de la voie de l'AngII.

5.7. CONCLUSION

Tout comme la prolifération cellulaire, l'apoptose est un phénomène qui peut être néfaste ou bénéfique selon le contexte. L'induction de l'apoptose au cours du traitement de l'hypertension artérielle apparaît avec ce projet de doctorat bénéfique et thérapeutique. En effet, l'augmentation de l'apoptose des CML vasculaires et des fibroblastes cardiaques par les inhibiteurs de la voie de l'AngII démontrent que le développement de l'hyperplasie cellulaire pathologique est un phénomène réversible. D'autre part, ces mêmes traitements inhibent l'apoptose délétère des cardiomyocytes à long terme. Dans l'ensemble, l'utilisation des bloqueurs du SRA semble optimiser les effets bénéfiques d'une thérapie antihypertensive efficace à long terme, en comparaison avec les thérapies conventionnelles par leurs effets antiprolifératifs et antioxydants puissants contribuant ainsi à corriger plus efficacement les anomalies cardiovasculaires reliés à l'hypertension artérielle.

BIBLIOGRAPHIE

1. Guide thérapeutique de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle. . 2002.
2. Hamet P. Données épidémiologiques du contrôle de la pression artérielle au Canada et leur impact sur la mortalité cardiovasculaire. Symposium satellite: Société Québécoise d'Hypertension Artérielle. *Médecine/Sciences*. 2003;19.
3. Joffres MR, Hamet P, MacLean DR, L'Italien G J, Fodor G. Distribution of blood pressure and hypertension in Canada and the United States. *Am J Hypertens*. 2001;14:1099-1105.
4. Chalmers J, Pilowsky P. Brainstem and bulbospinal neurotransmitter systems in the control of blood pressure. *J Hypertens*. 1991;9:675-694.
5. De Champlain J, Van Ameringen MR. Regulation of blood pressure by sympathetic nerve fibers and adrenal medulla in normotensive and hypertensive rats. *Circ Res*. 1972;31:617-628.
6. Campbell DJ. Tissue renin-angiotensin system: sites of angiotensin formation. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1987;10 Suppl 7:S1-8.
7. Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev*. 1993;45:205-251.
8. Sancho J, Re R, Burton J, Barger AC, Haber E. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in cardiovascular homeostasis in normal human subjects. *Circulation*. 1976;53:400-405.
9. Takahashi M, Fukuda K, Shimada K, Barnes K, Turner AJ, Ikeda M, Koike H, Yamamoto Y, Tanzawa K. Localization of rat endothelin-converting enzyme to vascular endothelial cells and some secretory cells. *Biochem J*. 1995;311 (Pt 2):657-665.
10. Grantham JA, Schirger JA, Williamson EE, Heublein DM, Wennberg PW, Kirchengast M, Muentner K, Subkowski T, Burnett JC, Jr. Enhanced

- endothelin-converting enzyme immunoreactivity in early atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;31 Suppl 1:S22-26.
11. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1988;332:411-415.
 12. Schiffrin EL, Touyz RM. Vascular biology of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;32 Suppl 3:S2-13.
 13. Gomez-Garre D, Ruiz-Ortega M, Ortego M, Largo R, Lopez-Armada MJ, Plaza JJ, Gonzalez E, Egido J. Effects and interactions of endothelin-1 and angiotensin II on matrix protein expression and synthesis and mesangial cell growth. *Hypertension.* 1996;27:885-892.
 14. Moreau P, d'Uscio LV, Shaw S, Takase H, Barton M, Luscher TF. Angiotensin II increases tissue endothelin and induces vascular hypertrophy: reversal by ET(A)-receptor antagonist. *Circulation.* 1997;96:1593-1597.
 15. Egido J. Vasoactive hormones and renal sclerosis. *Kidney Int.* 1996;49:578-597.
 16. Touyz RM. Molecular and cellular mechanisms regulating vascular function and structure--implications in the pathogenesis of hypertension. *Can J Cardiol.* 2000;16:1137-1146.
 17. Khraibi AA, Heublein DM, Knox FG, Burnett JC, Jr. Increased plasma level of endothelin-1 in the Okamoto spontaneously hypertensive rat. *Mayo Clin Proc.* 1993;68:42-46.
 18. Krum H, Viskoper RJ, Lacourciere Y, Budde M, Charlon V. The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. Bosentan Hypertension Investigators. *N Engl J Med.* 1998;338:784-790.
 19. Kannel WB, Wolf PA, McGee DL, Dawber TR, McNamara P, Castelli WP. Systolic blood pressure, arterial rigidity, and risk of stroke. The Framingham study. *Jama.* 1981;245:1225-1229.

20. Stamler J, Stamler R, Riedlinger WF, Algera G, Roberts RH. Hypertension screening of 1 million Americans. Community Hypertension Evaluation Clinic (CHEC) program, 1973 through 1975. *Jama*. 1976;235:2299-2306.
21. Corvol P, Jeunemaitre X. Molecular genetics of human hypertension: role of angiotensinogen. *Endocr Rev*. 1997;18:662-677.
22. Villard E, Lalau JD, van Hooft IS, Derkx FH, Houot AM, Pinet F, Corvol P, Soubrier F. A mutant renin gene in familial elevation of prorenin. *J Biol Chem*. 1994;269:30307-30312.
23. Tired L, Blanc H, Ruidavets JB, Arveiler D, Luc G, Jeunemaitre X, Tichet J, Mallet C, Poirier O, Plouin PF, Cambien F. Gene polymorphisms of the renin-angiotensin system in relation to hypertension and parental history of myocardial infarction and stroke: the PEGASE study. Projet d'Etude des Genes de l'Hypertension Arterielle Severe a moderee Essentielle. *J Hypertens*. 1998;16:37-44.
24. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*. 1990;86:1343-1346.
25. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Ricard S, et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature*. 1992;359:641-644.
26. Nakai K, Itoh C, Miura Y, Hotta K, Musha T, Itoh T, Miyakawa T, Iwasaki R, Hiramori K. Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese. *Circulation*. 1994;90:2199-2202.
27. Ezzati M, Lopez AD, Rodgers A, Vander Hoorn S, Murray CJ. Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *Lancet*. 2002;360:1347-1360.

28. Dzau VJ. Atherosclerosis and hypertension: mechanisms and interrelationships. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1990;15 Suppl 5:S59-64.
29. Gimbrone MA, Jr. Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 1995;75:67B-70B.
30. Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, Marsden PA. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:2479-2488.
31. Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 1992;267:24173-24176.
32. Shimokawa H, Flavahan NA, Vanhoutte PM. Loss of endothelial pertussis toxin-sensitive G protein function in atherosclerotic porcine coronary arteries. *Circulation*. 1991;83:652-660.
33. Harrison DG. Endothelial function and oxidant stress. *Clin Cardiol*. 1997;20:II-11-17.
34. Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertension*. 1989;13:658-667.
35. Auch-Schwelk W, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing factor(s) and calcium antagonists. *Z Kardiol*. 1989;78 Suppl 6:120-123.
36. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*. 2000;101:1899-1906.
37. Koller A. Signaling pathways of mechanotransduction in arteriolar endothelium and smooth muscle cells in hypertension. *Microcirculation*. 2002;9:277-294.
38. Rizzoni D, Castellano M, Porteri E, Bettoni G, Muiesan ML, Agabiti-Rosei E. Vascular structural and functional alterations before and after the development of hypertension in SHR. *Am J Hypertens*. 1994;7:193-200.

39. Taddei S, Virdis A, Mattei P, Ghiadoni L, Sudano I, Salvetti A. Defective L-arginine-nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients. *Circulation*. 1996;94:1298-1303.
40. Rossi GP, Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Albertin G, Favilla S, Sudano I, Pessina AC, Salvetti A. Exclusion of the ACE D/I gene polymorphism as a determinant of endothelial dysfunction. *Hypertension*. 2001;37:293-300.
41. Lockette W, Otsuka Y, Carretero O. The loss of endothelium-dependent vascular relaxation in hypertension. *Hypertension*. 1986;8:II61-66.
42. Levine GN, Frei B, Koulouris SN, Gerhard MD, Keaney JF, Jr., Vita JA. Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 1996;93:1107-1113.
43. Naftilan AJ, Williams R, Burt D, Paul M, Pratt RE, Hobart P, Chirgwin J, Dzau VJ. A lack of genetic linkage of renin gene restriction fragment length polymorphisms with human hypertension. *Hypertension*. 1989;14:614-618.
44. Weber MA, Smith DH, Neutel JM, Graettinger WF. Cardiovascular and metabolic characteristics of hypertension. *Am J Med*. 1991;91:4S-10S.
45. Neutel JM, Smith DH, Graettinger WF, Winer RL, Weber MA. Heredity and hypertension: impact on metabolic characteristics. *Am Heart J*. 1992;124:435-440.
46. Lang F. Osmotic diuresis. *Ren Physiol*. 1987;10:160-173.
47. Wittner M, Di Stefano A, Wangemann P, Greger R. How do loop diuretics act? *Drugs*. 1991;41 Suppl 3:1-13.
48. Tobian L. Why do thiazide diuretics lower blood pressure in essential hypertension? *Annu Rev Pharmacol*. 1967;7:399-408.
49. Implications of the systolic hypertension in the elderly program. The Systolic Hypertension in the Elderly Program Cooperative Research Group. *Hypertension*. 1993;21:335-343.

50. Materson BJ, Reda DJ, Cushman WC, Massie BM, Freis ED, Kochar MS, Hamburger RJ, Fye C, Lakshman R, Gottdiener J, et al. Single-drug therapy for hypertension in men. A comparison of six antihypertensive agents with placebo. The Department of Veterans Affairs Cooperative Study Group on Antihypertensive Agents. *N Engl J Med.* 1993;328:914-921.
51. Psaty BM, Smith NL, Siscovick DS, Koepsell TD, Weiss NS, Heckbert SR, Lemaitre RN, Wagner EH, Furberg CD. Health outcomes associated with antihypertensive therapies used as first-line agents. A systematic review and meta-analysis. *Jama.* 1997;277:739-745.
52. Frishman WH, Furberg CD, Friedewald WT. The use of beta-adrenergic blocking drugs in patients with myocardial infarction. *Curr Probl Cardiol.* 1984;9:1-50.
53. Frishman WH, Furberg CD, Friedewald WT. Beta-adrenergic blockade for survivors of acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1984;310:830-837.
54. Frishman WH. Carvedilol. *N Engl J Med.* 1998;339:1759-1765.
55. Buhler FR, Laragh JH, Baer L, Vaughan ED, Jr., Brunner HR. Propranolol inhibition of renin secretion. A specific approach to diagnosis and treatment of renin-dependent hypertensive diseases. *N Engl J Med.* 1972;287:1209-1214.
56. Christensson B, Nordenfelt I, Westling H, White T. Haemodynamic effects of nitroglycerin in normal subjects during supine and sitting exercise. *Br Heart J.* 1969;31:80-82.
57. Freedman DD, Waters DD. 'Second generation' dihydropyridine calcium antagonists. Greater vascular selectivity and some unique applications. *Drugs.* 1987;34:578-598.
58. Zimmerman BG, Sybertz EJ, Wong PC. Interaction between sympathetic and renin-angiotensin system. *J Hypertens.* 1984;2:581-587.

59. Padfield PL, Morton JJ. Effects of angiotensin II on arginine-vasopressin in physiological and pathological situations in man. *J Endocrinol.* 1977;74:251-259.
60. Mira ML, Silva MM, Manso CF. The scavenging of oxygen free radicals by angiotensin converting enzyme inhibitors: the importance of the sulfhydryl group in the chemical structure of the compounds. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;723:439-441.
61. Zusman RM. Effects of converting-enzyme inhibitors on the renin-angiotensin-aldosterone, bradykinin, and arachidonic acid-prostaglandin systems: correlation of chemical structure and biologic activity. *Am J Kidney Dis.* 1987;10:13-23.
62. Robertson JJ, Tillman DM. Converting enzyme inhibitors in the treatment of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1987;10 Suppl 7:S43-48.
63. Israili ZH, Hall WD. Cough and angioneurotic edema associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. A review of the literature and pathophysiology. *Ann Intern Med.* 1992;117:234-242.
64. Li JS, Lariviere R, Schiffrin EL. Effect of a nonselective endothelin antagonist on vascular remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Evidence for a role of endothelin in vascular hypertrophy. *Hypertension.* 1994;24:183-188.
65. Schiffrin EL, Lariviere R, Li JS, Sventek P. Enhanced expression of the endothelin-1 gene in blood vessels of DOCA-salt hypertensive rats: correlation with vascular structure. *J Vasc Res.* 1996;33:235-248.
66. Karam H, Heudes D, Bruneval P, Gonzales MF, Loffler BM, Clozel M, Clozel JP. Endothelin antagonism in end-organ damage of spontaneously hypertensive rats. Comparison with angiotensin-converting enzyme inhibition and calcium antagonism. *Hypertension.* 1996;28:379-385.
67. Boger RH, Bode-Boger SM. The clinical pharmacology of L-arginine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:79-99.

68. Drexler H, Zeiher AM, Meinzer K, Just H. Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine. *Lancet*. 1991;338:1546-1550.
69. Vallance P, Chan N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart*. 2001;85:342-350.
70. Cosentino F, Katusic ZS. Tetrahydrobiopterin and dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in coronary arteries. *Circulation*. 1995;91:139-144.
71. Cosentino F, Patton S, d'Uscio LV, Werner ER, Werner-Felmayer G, Moreau P, Malinski T, Luscher TF. Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. *J Clin Invest*. 1998;101:1530-1537.
72. Heitzer T, Brockhoff C, Mayer B, Warnholtz A, Mollnau H, Henne S, Meinertz T, Munzel T. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers : evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase. *Circ Res*. 2000;86:E36-41.
73. Ueda S, Matsuoka H, Miyazaki H, Usui M, Okuda S, Imaizumi T. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in long-term smokers. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35:71-75.
74. Mayer B, John M, Heinzel B, Werner ER, Wachter H, Schultz G, Bohme E. Brain nitric oxide synthase is a biopterin- and flavin-containing multi-functional oxido-reductase. *FEBS Lett*. 1991;288:187-191.
75. Schallreuter KU, Buttner G, Pittelkow MR, Wood JM, Swanson NN, Korner C. Cytotoxicity of 6-biopterin to human melanocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;204:43-48.
76. Verhaar MC, Wever RM, Kastelein JJ, van Dam T, Koomans HA, Rabelink TJ. 5-methyltetrahydrofolate, the active form of folic acid, restores endothelial function in familial hypercholesterolemia. *Circulation*. 1998;97:237-241.

77. Verhaar MC, Wever RM, Kastelein JJ, van Loon D, Milstien S, Koomans HA, Rabelink TJ. Effects of oral folic acid supplementation on endothelial function in familial hypercholesterolemia. A randomized placebo-controlled trial. *Circulation*. 1999;100:335-338.
78. Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet*. 1996;347:781-786.
79. Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. 2000;342:154-160.
80. Hercberg S, Preziosi P, Galan P, Faure H, Arnaud J, Duport N, Malvy D, Roussel AM, Briancon S, Favier A. "The SU.VI.MAX Study": a primary prevention trial using nutritional doses of antioxidant vitamins and minerals in cardiovascular diseases and cancers. SUPplementation on Vitamines et Mineraux AntioXydants. *Food Chem Toxicol*. 1999;37:925-930.
81. Resnick LM, Oparil S, Chait A, Haynes RB, Kris-Etherton P, Stern JS, Clark S, Holcomb S, Hatton DC, Metz JA, McMahon M, Pi-Sunyer FX, McCarron DA. Factors affecting blood pressure responses to diet: the Vanguard study. *Am J Hypertens*. 2000;13:956-965.
82. Dobrzynski E, Yoshida H, Chao J, Chao L. Adenovirus-mediated kallikrein gene delivery attenuates hypertension and protects against renal injury in deoxycorticosterone-salt rats. *Immunopharmacology*. 1999;44:57-65.
83. Raizada MK, Francis SC, Wang H, Gelband CH, Reaves PY, Katovich MJ. Targeting of the renin-angiotensin system by antisense gene therapy: a possible strategy for the long-term control of hypertension. *J Hypertens*. 2000;18:353-362.

84. Phillips MI. Gene therapy for hypertension: the preclinical data. *Methods Enzymol.* 2002;346:3-13.
85. Gray SD. Spontaneous hypertension in the neonatal rat. A review. *Clin Exp Hypertens A.* 1984;6:755-781.
86. Gray SD. Pressure profiles in neonatal spontaneously hypertensive rats. *Biol Neonate.* 1984;45:25-32.
87. Yamori Y. Neural and non-neural mechanisms in spontaneous hypertension. *Clin Sci Mol Med Suppl.* 1976;3:431s-434s.
88. Yamori Y, Mori C, Nishio T, Ooshima A, Horie R, Ohtaka M, Soeda T, Saito M, Abe K, Nara Y, Nakao Y, Kihara M. Cardiac hypertrophy in early hypertension. *Am J Cardiol.* 1979;44:964-969.
89. Frohlich ED. Hemodynamics and other determinants in development of left ventricular hypertrophy. *Fed Proc.* 1983;42:2709-2715.
90. Frohlich ED. Is the spontaneously hypertensive rat a model for human hypertension? *J Hypertens Suppl.* 1986;4:S15-19.
91. Hamet P, Hadrava V, Kruppa U, Tremblay J. Vascular smooth muscle cell hyper-responsiveness to growth factors in hypertension. *J Hypertens Suppl.* 1988;6:S36-39.
92. Hamet P, Richard L, Dam TV, Teiger E, Orlov SN, Gaboury L, Gossard F, Tremblay J. Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension.* 1995;26:642-648.
93. Thorin-Trescases N, deBlois D, Hamet P. Evidence of an altered in vivo vascular cell turnover in spontaneously hypertensive rats and its modulation by long-term antihypertensive treatment. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001;38:764-774.
94. Marshall BC, Santana A, Xu QP, Petersen MJ, Campbell EJ, Hoidal JR, Welgus HG. Metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in mesothelial cells. Cellular differentiation influences expression. *J Clin Invest.* 1993;91:1792-1799.

95. Ou R, Sun Y, Ganjam VK, Weber KT. In situ production of angiotensin II by fibrosed rat pericardium. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28:1319-1327.
96. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation.* 1991;83:1849-1865.
97. Zak R. Cell proliferation during cardiac growth. *Am J Cardiol.* 1973;31:211-219.
98. James TN. Small arteries of the heart. *Circulation.* 1977;56:2-14.
99. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med.* 1990;322:1561-1566.
100. Anversa P, Olivetti G, Melissari M, Loud AV. Morphometric study of myocardial hypertrophy induced by abdominal aortic stenosis. *Lab Invest.* 1979;40:341-349.
101. Weber KT, Clark WA, Janicki JS, Shroff SG. Physiologic versus pathologic hypertrophy and the pressure-overloaded myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1987;10 Suppl 6:S37-50.
102. Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol.* 1989;13:1637-1652.
103. Negoro N, Inariba H, Inoue T, Kanayama Y, Takeda T. Expression of c-myc proto-oncogene in hearts and cultured smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens Suppl.* 1988;6:S128-130.
104. Donohue TJ, Dworkin LD, Lango MN, Fliegner K, Lango RP, Benstein JA, Slater WR, Catanese VM. Induction of myocardial insulin-like growth factor-I gene expression in left ventricular hypertrophy. *Circulation.* 1994;89:799-809.
105. Chien K, Olson E. Converging pathways and principles in the heart development and disease. *Cell.* 2002;110:153-162.
106. Anversa P, Olivetti G. Cellular basis of physiological and pathological myocardial growth. In: Page E, Fozzard H, Solaro RJ, eds *HAndbook of*

physiology. The cardiovascular system: The heart. New York, NY: Oxford University Press. 2002:75-144.

107. Anversa P, Ricci R, Olivetti G. Quantitative structural analysis of the myocardium during physiologic growth and induced cardiac hypertrophy: a review. *J Am Coll Cardiol.* 1986;7:1140-1149.
108. Katz AM. Cardiomyopathy of overload. A major determinant of prognosis in congestive heart failure. *N Engl J Med.* 1990;322:100-110.
109. Swynghedauw B. Remodelling of the heart in response to chronic mechanical overload. *Eur Heart J.* 1989;10:935-943.
110. Frenzel H, Schwartzkopff B, Rettig B, Vogelsang H. Morphologic criteria of progression and regression of cardiac hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1987;10 Suppl 6:S20-28.
111. Olivetti G, Melissari M, Balbi T, Quaini F, Cigola E, Sonnenblick E, Anversa P. Myocyte cellular hypertrophy is responsible for ventricular remodeling in the hypertrophied heart of middle aged individuals in the absence of cardiac failure. *Cardiovascular Res.* 1994;79:358-364.
112. Olivetti G, Cigola E, Maestri R, Corraoli D, Lagrasta C, Gambert S, Anversa P. Aging, cardiac hypertrophy and ischemic cardiomyopathy do not affect the proportion of mononucleated and multinucleated myocytes in the human heart. *J mol cell cardiol.* 1996;28:1463-1477.
113. Olivetti G, Melissari M, Balbi T, Quaini F, Cigola E, Sonnenblick E, Anversa P. Myocyte nuclear and possible cellular hyperplasia contribute to ventricular remodeling in the hypertrophic senescent heart in human. *J Am Coll Cardiol.* 1994;24:140-149.
114. Anversa P, Palackal T, Sonnenblick EH, Olivetti G, Capasso JM. Hypertensive cardiomyopathy. Myocyte nuclei hyperplasia in the mammalian rat heart. *J Clin Invest.* 1990;85:994-997.
115. Anversa P, Nadal-Ginard B. Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature.* 2002;415:240-243.

116. Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res*. 2003;92:139-150.
117. Anderson KR, Sutton MG, Lie JT. Histopathological types of cardiac fibrosis in myocardial disease. *J Pathol*. 1979;128:79-85.
118. Cheitlin MD, Robinowitz M, McAllister H, Hoffman JI, Bharati S, Lev M. The distribution of fibrosis in the left ventricle in congenital aortic stenosis and coarctation of the aorta. *Circulation*. 1980;62:823-830.
119. Huysman JA, Vliegen HW, Van der Laarse A, Eulerink F. Changes in nonmyocyte tissue composition associated with pressure overload of hypertrophic human hearts. *Pathol Res Pract*. 1989;184:577-581.
120. Schwartzkopff B, Frenzel H, Dieckerhoff J, Betz P, Flasshove M, Schulte HD, Mundhenke M, Motz W, Strauer BE. Morphometric investigation of human myocardium in arterial hypertension and valvular aortic stenosis. *Eur Heart J*. 1992;13 Suppl D:17-23.
121. Bing RJ, Oliver MF, Schwartz A. Symposium on Myocardial Blood Flow in Man--Methods and Significance in Myocardial Disease; Pisa, Italy; June 10-12, 1971. Report of the session on ischemia. *Cardiology*. 1972;57:98-102.
122. Fujita M, Mikuniya A, McKown DP, McKown MD, Franklin D. Regional myocardial volume alterations induced by brief repeated coronary occlusion in conscious dogs. *J Am Coll Cardiol*. 1988;12:1048-1053.
123. Weber KT, Brilla CG, Campbell SE, Guarda E, Zhou G, Sriram K. Myocardial fibrosis: role of angiotensin II and aldosterone. *Basic Res Cardiol*. 1993;88 Suppl 1:107-124.
124. Olivetti G, Anversa P, Loud AV. Morphometric study of early postnatal development in the left and right ventricular myocardium of the rat. II. Tissue composition, capillary growth, and sarcoplasmic alterations. *Circ Res*. 1980;46:503-512.

125. Olivetti G, Capasso JM, Sonnenblick EH, Anversa P. Side-to-side slippage of myocytes participates in ventricular wall remodeling acutely after myocardial infarction in rats. *Circ Res.* 1990;67:23-34.
126. Capasso JM, Jeanty MW, Palackal T, Olivetti G, Anversa P. Ventricular remodeling induced by acute nonocclusive constriction of coronary artery in rats. *Am J Physiol.* 1989;257:H1983-1993.
127. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol.* 1999;277:C1-9.
128. Sun Y, Weber KT. Angiotensin II receptor binding following myocardial infarction in the rat. *Cardiovasc Res.* 1994;28:1623-1628.
129. Eid H, Larson DM, Springhorn JP, Attawia MA, Nayak RC, Smith TW, Kelly RA. Role of epicardial mesothelial cells in the modification of phenotype and function of adult rat ventricular myocytes in primary coculture. *Circ Res.* 1992;71:40-50.
130. Brush JE, Jr., Cannon RO, 3rd, Schenke WH, Bonow RO, Leon MB, Maron BJ, Epstein SE. Angina due to coronary microvascular disease in hypertensive patients without left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med.* 1988;319:1302-1307.
131. Houghton JL, Frank MJ, Carr AA, von Dohlen TW, Prisant LM. Relations among impaired coronary flow reserve, left ventricular hypertrophy and thallium perfusion defects in hypertensive patients without obstructive coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 1990;15:43-51.
132. Mulvany MJ. Vascular growth in hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1992;20 Suppl 1:S7-11.
133. Tomanek RJ, Palmer PJ, Peiffer GL, Schreiber KL, Eastham CL, Marcus ML. Morphometry of canine coronary arteries, arterioles, and capillaries during hypertension and left ventricular hypertrophy. *Circ Res.* 1986;58:38-46.

134. Zhu YC, Zhu YZ, Gohlke P, Stauss HM, Unger T. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II AT1 receptor antagonism on cardiac parameters in left ventricular hypertrophy. *Am J Cardiol.* 1997;80:110A-117A.
135. Gohlke P, Linz W, Scholkens B, Van Even P, Martorana P, Unger T. Vascular and cardiac protection by ramipril in spontaneously hypertensive rats: prevention versus regression study [published erratum appears in Br J Clin Pract Symp Suppl 1996 Sep;50(6):293]. *Br J Clin Pract Suppl.* 1996;84:1-10.
136. Unger T, Mattfeldt T, Lamberty V, Bock P, Mall G, Linz W, Scholkens BA, Gohlke P. Effect of early onset angiotensin converting enzyme inhibition on myocardial capillaries. *Hypertension.* 1992;20:478-482.
137. Lee RM. Structural alterations of blood vessels in hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 1987;65:1528-1535.
138. Owens GK. Control of hypertrophic versus hyperplastic growth of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1989;257:H1755-1765.
139. Smeda JS, Lee RM, Forrest JB. Structural and reactivity alterations of the renal vasculature of spontaneously hypertensive rats prior to and during established hypertension. *Circ Res.* 1988;63:518-533.
140. Evenwel RT, Kasbergen CM, Struyker-Boudier HA. Central and regional hemodynamics and plasma volume distribution during the development of spontaneous hypertension in rats. *Clin Exp Hypertens A.* 1983;5:1511-1536.
141. De Mey JG, Daemen MJ, Boonen HC, Bosman FT, Dijkstra EH, Fazzi GE, Janssen GM, Schiffers PM, Struyker-Boudier HA, Vrijdag MJ. In vivo DNA synthesis is not uniformly increased in arterial smooth muscle of young spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 1991;9:695-701.
142. Bendeck MP, Zempo N, Clowes AW, Galardy RE, Reidy MA. Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circ Res.* 1994;75:539-545.

143. Strauss BH, Robinson R, Batchelor WB, Chisholm RJ, Ravi G, Natarajan MK, Logan RA, Mehta SR, Levy DE, Ezrin AM, Keeley FW. In vivo collagen turnover following experimental balloon angioplasty injury and the role of matrix metalloproteinases. *Circ Res.* 1996;79:541-550.
144. Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N, Mulvany MJ. Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. *Hypertension.* 1993;21:391-397.
145. Mulvany MJ, Aalkjaer C. Structure and function of small arteries. *Physiol Rev.* 1990;70:921-961.
146. Korsgaard N, Mulvany MJ. Cellular hypertrophy in mesenteric resistance vessels from renal hypertensive rats. *Hypertension.* 1988;12:162-167.
147. Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation.* 1997;95:588-593.
148. Kerr S, Brosnan MJ, McIntyre M, Reid JL, Dominiczak AF, Hamilton CA. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium. *Hypertension.* 1999;33:1353-1358.
149. Alexander RW. Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension.* 1995;25:155-161.
150. Touyz RM. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2000;2:98-105.
151. Mulvany MJ. Remodeling of resistance vessel structure in essential hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1993;2:77-81.
152. Nakashima Y, Fouad FM, Tarazi RC. Regression of left ventricular hypertrophy from systemic hypertension by enalapril. *Am J Cardiol.* 1984;53:1044-1049.

153. Strauer BE, Atef Mahmoud M, Bayer F, Bohn I, Motz U. Reversal of left ventricular hypertrophy and improvement of cardiac function in man by nifedipine. *Eur Heart J*. 1984;5 Suppl F:53-60.
154. Strauer BE, Bayer F, Brecht HM, Motz W. The influence of sympathetic nervous activity on regression of cardiac hypertrophy. *J Hypertens Suppl*. 1985;3:S39-44.
155. Fouad FM, Nakashima Y, Tarazi RC, Salcedo EE. Reversal of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients treated with methyldopa. Lack of association with blood pressure control. *Am J Cardiol*. 1982;49:795-801.
156. Schulman SP, Weiss JL, Becker LC, Gottlieb SO, Woodruff KM, Weisfeldt ML, Gerstenblith G. The effects of antihypertensive therapy on left ventricular mass in elderly patients. *N Engl J Med*. 1990;322:1350-1356.
157. Sau F, Seguro C, Alberti D, Cherchi A. [Reduction of left ventricular hypertrophy and increased tolerance to exertion in hypertensive patients after antihypertensive therapy with slow-release oxprenolol and chlorthalidone]. *Cardiologia*. 1986;31:701-708.
158. Kromer EP, Riegger GA. Effects of long-term angiotensin converting enzyme inhibition on myocardial hypertrophy in experimental aortic stenosis in the rat. *Am J Cardiol*. 1988;62:161-163.
159. Ostman-Smith I. Cardiac sympathetic nerves as the final common pathway in the induction of adaptive cardiac hypertrophy. *Clin Sci (Lond)*. 1981;61:265-272.
160. Schunkert H, Dzau VJ, Tang SS, Hirsch AT, Apstein CS, Lorell BH. Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. *J Clin Invest*. 1990;86:1913-1920.

161. Laks MM, Morady F. Norepinephrine--the myocardial hypertrophy hormone? *Am Heart J*. 1976;91:674-675.
162. McLenachan JM, Henderson E, Morris KI, Dargie HJ. Ventricular arrhythmias in patients with hypertensive left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med*. 1987;317:787-792.
163. Tsoporis J, Fields N, Lee RM, Leenen FH. Effects of the arterial vasodilator minoxidil on cardiovascular structure and sympathetic activity in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 1993;11:1337-1345.
164. Jespersen LT, Nyborg NC, Pedersen OL, Mikkelsen EO, Mulvany MJ. Cardiac mass and peripheral vascular structure in hydralazine-treated spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1985;7:734-741.
165. Schmieder RE, Martus P, Klingbeil A. Reversal of left ventricular hypertrophy in essential hypertension. A meta-analysis of randomized double-blind studies. *Jama*. 1996;275:1507-1513.
166. van Krimpen C, Smits JF, Cleutjens JP, Debets JJ, Schoemaker RG, Struyker Boudier HA, Bosman FT, Daemen MJ. DNA synthesis in the non-infarcted cardiac interstitium after left coronary artery ligation in the rat: effects of captopril. *J Mol Cell Cardiol*. 1991;23:1245-1253.
167. Smits JF, van Krimpen C, Schoemaker RG, Cleutjens JP, Daemen MJ. Angiotensin II receptor blockade after myocardial infarction in rats: effects on hemodynamics, myocardial DNA synthesis, and interstitial collagen content. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992;20:772-778.
168. Safar ME, Levy BI, London GM. Arterial structure in hypertension and the effects of angiotensin converting enzyme inhibition. *J Hypertens Suppl*. 1992;10:S51-57.
169. Mulvany MJ. Determinants of vascular structure. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992;19 Suppl 5:S1-6.
170. Mulvany MJ. The development and regression of vascular hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992;19 Suppl 2:S22-27.

171. Lee RM, Owens GK, Scott-Burden T, Head RJ, Mulvany MJ, Schiffrin EL. Pathophysiology of smooth muscle in hypertension. *Can J Physiol Pharmacol.* 1995;73:574-584.
172. Folkow B. "Structural factor" in primary and secondary hypertension. *Hypertension.* 1990;16:89-101.
173. Safar ME, Laurent S. Behaviour of conduit arteries in hypertension. *Clin Exp Hypertens.* 1993;15:1033-1045.
174. Ko Y, Totzke G, Graack GH, Heidgen FJ, Meyer zu Brickwedde MK, Dusing R, Vetter H, Sachinidis A. Action of dihydropyridine calcium antagonists on early growth response gene expression and cell growth in vascular smooth muscle cells. *J Hypertens.* 1993;11:1171-1178.
175. Zhu DL, Herembert T, Caruelle D, Caruelle JP, Marche P. Involvement of calcium channels in fibroblast growth factor-induced activation of arterial cells in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1994;23:395-400.
176. Munro E, Patel M, Chan P, Betteridge L, Gallagher K, Schachter M, Wolfe J, Sever P. Effect of calcium channel blockers on the growth of human vascular smooth muscle cells derived from saphenous vein and vascular graft stenoses. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1994;23:779-784.
177. Jackson CL, Schwartz SM. Pharmacology of smooth muscle cell replication. *Hypertension.* 1992;20:713-736.
178. Lichtlen PR, Hugenholtz PG, Rafflenbeul W, Hecker H, Jost S, Deckers JW. Retardation of angiographic progression of coronary artery disease by nifedipine. Results of the International Nifedipine Trial on Antiatherosclerotic Therapy (INTACT). INTACT Group Investigators. *Lancet.* 1990;335:1109-1113.
179. Nyborg NC, Mulvany MJ. Lack of effect of anti-hypertensive treatment with felodipine on cardiovascular structure of young spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 1985;19:528-536.

180. Freslon JL, Giudicelli JF. Compared myocardial and vascular effects of captopril and dihydralazine during hypertension development in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. 1983;80:533-543.
181. Schachter M. Drug-induced modification of vascular structure: effects of antihypertensive drugs. *Am Heart J*. 1991;122:316-323.
182. Lee RM, Berecek KH, Tsoporis J, McKenzie R, Triggle CR. Prevention of hypertension and vascular changes by captopril treatment. *Hypertension*. 1991;17:141-150.
183. Clozel JP, Kuhn H, Hefti F. Vascular protection with cilazapril in hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992;19 Suppl 5:S28-33.
184. Clozel JP, Kuhn H, Hefti F. Decreases of vascular hypertrophy in four different types of arteries in spontaneously hypertensive rats. *Am J Med*. 1989;87:92S-95S.
185. Christensen KL, Jespersen LT, Mulvany MJ. Development of blood pressure in spontaneously hypertensive rats after withdrawal of long-term treatment related to vascular structure. *J Hypertens*. 1989;7:83-90.
186. Cadilhac M, Giudicelli JF. Myocardial and vascular effects of perindopril, a new converting enzyme inhibitor, during hypertension development in spontaneously hypertensive rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1986;284:114-126.
187. Black MJ, Adams MA, Bobik A, Campbell JH, Campbell GR. Effect of enalapril on aortic smooth muscle cell polyploidy in the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens*. 1989;7:997-1003.
188. Schiffers PM, Struyker-Boudier HA, De Mey JG. Effects of angiotensin II and angiotensin converting enzyme inhibitors on contractile and growth responses in isolated carotid arteries of the rat. *Basic Res Cardiol*. 1991;86 Suppl 1:83-89.
189. Fernandez LA, Caride VJ, Twickler J, Galardy RE. Renin-angiotensin and development of collateral circulation after renal ischemia. *Am J Physiol*. 1982;243:H869-875.

190. Nelissen-Vrancken HJ, Boudier HA, Daemen MJ, Smits JF. Antihypertensive therapy and adaptive mechanisms in peripheral ischemia. *Hypertension*. 1993;22:780-788.
191. Linz W, Wohlfart P, Schoelkens BA, Becker RH, Malinski T, Wiemer G. Late treatment with ramipril increases survival in old spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1999;34:291-295.
192. Rubanyi GM, Kauser K, Graser T. Effect of cilazapril and indomethacin on endothelial dysfunction in the aortas of spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993;22 Suppl 5:S23-30.
193. Tschudi MR, Criscione L, Novosel D, Pfeiffer K, Luscher TF. Antihypertensive therapy augments endothelium-dependent relaxations in coronary arteries of spontaneously hypertensive rats. *Circulation*. 1994;89:2212-2218.
194. Clozel M, Kuhn H, Hefti F. Effects of angiotensin converting enzyme inhibitors and of hydralazine on endothelial function in hypertensive rats. *Hypertension*. 1990;16:532-540.
195. Nunes GL, Sgoutas DS, Redden RA, Sigman SR, Gravanis MB, King SB, 3rd, Berk BC. Combination of vitamins C and E alters the response to coronary balloon injury in the pig. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:156-165.
196. Unger T. Neurohormonal modulation in cardiovascular disease. *Am Heart J*. 2000;139:S2-8.
197. Grise C, Boucher R, Thibault G, Genest J. Formation of angiotensin II by tonin from partially purified human angiotensinogen. *Can J Biochem*. 1981;59:250-255.
198. Lopez JJ, Lorell BH, Ingelfinger JR, Weinberg EO, Schunkert H, Diamant D, Tang SS. Distribution and function of cardiac angiotensin AT1- and AT2-receptor subtypes in hypertrophied rat hearts. *Am J Physiol*. 1994;267:H844-852.

199. Sodoshima J. Cytokine action of angiotensin II. *Circ Res.* 2000;86:1187-1189.
200. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med.* 1997;336:1066-1071.
201. Touyz RM, Endemann D, He G, Li JS, Schiffrin EL. Role of AT₂ receptors in angiotensin II-stimulated contraction of small mesenteric arteries in young SHR. *Hypertension.* 1999;33:366-372.
202. Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med.* 1994;330:1431-1438.
203. Duff JL, Berk BC, Corson MA. Angiotensin II stimulates the pp44 and pp42 mitogen-activated protein kinases in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;188:257-264.
204. Tsuda T, Kawahara Y, Ishida Y, Koide M, Shii K, Yokoyama M. Angiotensin II stimulates two myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinases in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1992;71:620-630.
205. Kusuhashi M, Takahashi E, Peterson TE, Abe J, Ishida M, Han J, Ulevitch R, Berk BC. p38 Kinase is a negative regulator of angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle cells: effects on Na⁺/H⁺ exchange and ERK1/2. *Circ Res.* 1998;83:824-831.
206. Schmitz U, Ishida T, Ishida M, Surapisitchat J, Hasham MI, Pelech S, Berk BC. Angiotensin II stimulates p21-activated kinase in vascular smooth muscle cells: role in activation of JNK. *Circ Res.* 1998;82:1272-1278.
207. Kim S, Iwao H. Activation of mitogen-activated protein kinases in cardiovascular hypertrophy and remodeling. *Jpn J Pharmacol.* 1999;80:97-102.
208. Gibbons GH, Pratt RE, Dzau VJ. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-beta 1

- expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin Invest.* 1992;90:456-461.
209. Itoh H, Mukoyama M, Pratt RE, Gibbons GH, Dzau VJ. Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *J Clin Invest.* 1993;91:2268-2274.
 210. Naftilan AJ, Pratt RE, Dzau VJ. Induction of platelet-derived growth factor A-chain and c-myc gene expressions by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1989;83:1419-1424.
 211. Liu G, Espinosa E, Oemar BS, Luscher TF. Bimodal effects of angiotensin II on migration of human and rat smooth muscle cells. Direct stimulation and indirect inhibition via transforming growth factor-beta 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1251-1257.
 212. Delafontaine P, Lou H. Angiotensin II regulates insulin-like growth factor I gene expression in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1993;268:16866-16870.
 213. Williams B, Baker AQ, Gallacher B, Lodwick D. Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 1995;25:913-917.
 214. Berk BC, Vekshtein V, Gordon HM, Tsuda T. Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 1989;13:305-314.
 215. Hirata Y, Kanno K, Eguchi S, Kano H. Effect of an AT1 receptor antagonist (CV-11974) on angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy in vitro. *Blood Press Suppl.* 1994;5:84-88.
 216. Kim S, Murakami T, Izumi Y, Yano M, Miura K, Yamanaka S, Iwao H. Extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase activities are continuously and differentially increased in aorta of hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;236:199-204.
 217. Hamaguchi A, Kim S, Izumi Y, Zhan Y, Yamanaka S, Iwao H. Contribution of extracellular signal-regulated kinase to angiotensin II-

- induced transforming growth factor-beta1 expression in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 1999;34:126-131.
218. Owens GK, Schwartz SM. Vascular smooth muscle cell hypertrophy and hyperploidy in the Goldblatt hypertensive rat. *Circ Res*. 1983;53:491-501.
 219. Owens GK. Influence of blood pressure on development of aortic medial smooth muscle hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1987;9:178-187.
 220. Kajstura J, Cigola E, Malhotra A, Li P, Cheng W, Meggs LG, Anversa P. Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29:859-870.
 221. Mazzolai L, Pedrazzini T, Nicoud F, Gabbiani G, Brunner HR, Nussberger J. Increased cardiac angiotensin II levels induce right and left ventricular hypertrophy in normotensive mice. *Hypertension*. 2000;35:985-991.
 222. Eguchi S, Iwasaki H, Ueno H, Frank GD, Motley ED, Eguchi K, Marumo F, Hirata Y, Inagami T. Intracellular signaling of angiotensin II-induced p70 S6 kinase phosphorylation at Ser(411) in vascular smooth muscle cells. Possible requirement of epidermal growth factor receptor, Ras, extracellular signal-regulated kinase, and Akt. *J Biol Chem*. 1999;274:36843-36851.
 223. Eguchi S, Iwasaki H, Hirata Y, Frank GD, Motley ED, Yamakawa T, Numaguchi K, Inagami T. Epidermal growth factor receptor is indispensable for c-Fos expression and protein synthesis by angiotensin II. *Eur J Pharmacol*. 1999;376:203-206.
 224. Linseman DA, Benjamin CW, Jones DA. Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1995;270:12563-12568.
 225. Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-

- function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:10663-10667.
226. Fischer TA, Singh K, O'Hara DS, Kaye DM, Kelly RA. Role of AT1 and AT2 receptors in regulation of MAPKs and MKP-1 by ANG II in adult cardiac myocytes. *Am J Physiol*. 1998;275:H906-916.
 227. Horiuchi M, Hayashida W, Kambe T, Yamada T, Dzau VJ. Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis. *J Biol Chem*. 1997;272:19022-19026.
 228. Huang XC, Sumners C, Richards EM. Angiotensin II stimulates protein phosphatase 2A activity in cultured neuronal cells via type 2 receptors in a pertussis toxin sensitive fashion. *Adv Exp Med Biol*. 1996;396:209-215.
 229. Bedecs K, Elbaz N, Sutren M, Masson M, Susini C, Strosberg AD, Nahmias C. Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase. *Biochem J*. 1997;325 (Pt 2):449-454.
 230. Nouet S, Nahmias C. Signal transduction from the angiotensin II AT2 receptor. *Trends Endocrinol Metab*. 2000;11:1-6.
 231. Tea BS, Der Sarkissian S, Touyz RM, Hamet P, deBlois D. Proapoptotic and Growth-Inhibitory Role of Angiotensin II Type 2 Receptor in Vascular Smooth Muscle Cells of Spontaneously Hypertensive Rats In Vivo. *Hypertension*. 2000;35:1069-1073.
 232. Sabri A, Levy BI, Poitevin P, Caputo L, Faggin E, Marotte F, Rappaport L, Samuel JL. Differential roles of AT1 and AT2 receptor subtypes in vascular trophic and phenotypic changes in response to stimulation with angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:257-264.
 233. Levy BI, Benessiano J, Henrion D, Caputo L, Heymes C, Duriez M, Poitevin P, Samuel JL. Chronic blockade of AT2-subtype receptors prevents the effect of angiotensin II on the rat vascular structure. *J Clin Invest*. 1996;98:418-425.

234. Li JS, Touyz RM, Schiffrin EL. Effects of AT1 and AT2 angiotensin receptor antagonists in angiotensin II-infused rats. *Hypertension*. 1998;31:487-492.
235. van Kleef EM, Fingerle J, Daemen MJ. Angiotensin II-induced progression of neointimal thickening in the balloon-injured rat carotid artery is AT1 receptor mediated. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:857-863.
236. Diep QN, Li JS, Schiffrin EL. In vivo study of AT(1) and AT(2) angiotensin receptors in apoptosis in rat blood vessels. *Hypertension*. 1999;34:617-624.
237. Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ Res*. 1997;81:970-976.
238. Fukuo K, Nakahashi T, Nomura S, Hata S, Suhara T, Shimizu M, Tamatani M, Morimoto S, Kitamura Y, Ogihara T. Possible participation of Fas-mediated apoptosis in the mechanism of atherosclerosis. *Gerontology*. 1997;43 Suppl 1:35-42.
239. Pollman MJ, Yamada T, Horiuchi M, Gibbons GH. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res*. 1996;79:748-756.
240. Nishio E, Fukushima K, Shiozaki M, Watanabe Y. Nitric oxide donor SNAP induces apoptosis in smooth muscle cells through cGMP-independent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;221:163-168.
241. Geng YJ, Wu Q, Muszynski M, Hansson GK, Libby P. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:19-27.

242. Gohlke P, Pees C, Unger T. AT₂ receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. *Hypertension*. 1998;31:349-355.
243. Seyedi N, Xu X, Nasjletti A, Hintze TH. Coronary kinin generation mediates nitric oxide release after angiotensin receptor stimulation. *Hypertension*. 1995;26:164-170.
244. Diez J, Panizo A, Hernandez M, Pardo J. Is the regulation of apoptosis altered in smooth muscle cells of adult spontaneously hypertensive rats? *Hypertension*. 1997;29:776-780.
245. Hamet P, deBlois D, Dam TV, Richard L, Teiger E, Tea BS, Orlov SN, Tremblay J. Apoptosis and vascular wall remodeling in hypertension. *Can J Physiol Pharmacol*. 1996;74:850-861.
246. Hamet P, Moreau P, Dam T-V, Orlov SN, Tea B-S, deBlois D, Tremblay J. The time window of apoptosis: a new component in the therapeutic strategy for cardiovascular remodeling. *Journal of Hypertension*. 1996;14 (Suppl 5):S65-S70.
247. Diez J, Panizo A, Hernandez M, Vega F, Sola I, Fortuno MA, Pardo J. Cardiomyocyte apoptosis and cardiac angiotensin-converting enzyme in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997;30:1029-1034.
248. deBlois D, Tea BS, Than VD, Tremblay J, Hamet P. Smooth muscle apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997;29:340-349.
249. Fortuno MA, Ravassa S, Etayo JC, Diez J. Overexpression of Bax protein and enhanced apoptosis in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats: effects of AT₁ blockade with losartan. *Hypertension*. 1998;32:280-286.
250. Flesch M, Margulies KB, Mochmann HC, Engel D, Sivasubramanian N, Mann DL. Differential regulation of mitogen-activated protein kinases in the failing human heart in response to mechanical unloading. *Circulation*. 2001;104:2273-2276.

251. Bueno OF, Molkentin JD. Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circ Res*. 2002;91:776-781.
252. Communal C, Colucci WS, Remondino A, Sawyer DB, Port JD, Wichman SE, Bristow MR, Singh K. Reciprocal modulation of mitogen-activated protein kinases and mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 and 2 in failing human myocardium. *J Card Fail*. 2002;8:86-92.
253. deBlois D, Orlov SN, Hamet P. Apoptosis in cardiovascular remodeling--effect of medication. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2001;15:539-545.
254. Lijnen P, Petrov V. Renin-angiotensin system, hypertrophy and gene expression in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31:949-970.
255. Ravassa S, Fortuno MA, Gonzalez A, Lopez B, Zalba G, Fortuno A, Diez J. Mechanisms of increased susceptibility to angiotensin II-induced apoptosis in ventricular cardiomyocytes of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2000;36:1065-1071.
256. Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Molecular and cellular mechanism of angiotensin II-mediated apoptosis. *Endocr Res*. 1998;24:307-314.
257. Li W, Ye Y, Fu B, Wang J, Yu L, Ichiki T, Inagami T, Ichikawa I, Chen X. Genetic deletion of AT2 receptor antagonizes angiotensin II-induced apoptosis in fibroblasts of the mouse embryo. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;250:72-76.
258. Li D, Yang B, Philips MI, Mehta JL. Proapoptotic effects of ANG II in human coronary artery endothelial cells: role of AT1 receptor and PKC activation. *Am J Physiol*. 1999;276:H786-792.
259. Opie LH, Sack MN. Enhanced angiotensin II activity in heart failure: reevaluation of the counterregulatory hypothesis of receptor subtypes. *Circ Res*. 2001;88:654-658.
260. Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest*. 1995;95:651-657.

261. Senbonmatsu T, Ichihara S, Price E, Jr., Gaffney FA, Inagami T. Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during in vivo pressure overload. *J Clin Invest.* 2000;106:R25-R29.
262. Ichihara S, Senbonmatsu T, Price E, Jr., Ichiki T, Gaffney FA, Inagami T. Angiotensin II type 2 receptor is essential for left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis in chronic angiotensin II-induced hypertension. *Circulation.* 2001;104:346-351.
263. Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension.* 1999;33:613-621.
264. Otsuka S, Sugano M, Makino N, Sawada S, Hata T, Niho Y. Interaction of mRNAs for angiotensin II type 1 and type 2 receptors to vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1998;32:467-472.
265. Kato H, Suzuki H, Tajima S, Ogata Y, Tominaga T, Sato A, Saruta T. Angiotensin II stimulates collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *J Hypertens.* 1991;9:17-22.
266. Tamura K, Nyui N, Tamura N, Fujita T, Kihara M, Toya Y, Takasaki I, Takagi N, Ishii M, Oda K, Horiuchi M, Umemura S. Mechanism of angiotensin II-mediated regulation of fibronectin gene in rat vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1998;273:26487-26496.
267. Scott-Burden T, Resink TJ, Hahn AW, Buhler FR. Induction of thrombospondin expression in vascular smooth muscle cells by angiotensin II. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1990;16 Suppl 7:S17-20.
268. Mackie EJ, Scott-Burden T, Hahn AW, Kern F, Bernhardt J, Regenass S, Weller A, Buhler FR. Expression of tenascin by vascular smooth muscle cells. Alterations in hypertensive rats and stimulation by angiotensin II. *Am J Pathol.* 1992;141:377-388.

269. Sharifi BG, LaFleur DW, Pirola CJ, Forrester JS, Fagin JA. Angiotensin II regulates tenascin gene expression in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1992;267:23910-23915.
270. Weber KT. Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. *Circulation.* 1997;96:4065-4082.
271. Weber KT. Fibrosis, a common pathway to organ failure: angiotensin II and tissue repair. *Semin Nephrol.* 1997;17:467-491.
272. Laviades C, Varo N, Fernandez J, Mayor G, Gil MJ, Monreal I, Diez J. Abnormalities of the extracellular degradation of collagen type I in essential hypertension. *Circulation.* 1998;98:535-540.
273. Kim S, Ohta K, Hamaguchi A, Omura T, Yukimura T, Miura K, Inada Y, Ishimura Y, Chatani F, Iwao H. Angiotensin II type I receptor antagonist inhibits the gene expression of transforming growth factor-beta 1 and extracellular matrix in cardiac and vascular tissues of hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995;273:509-515.
274. Ohta K, Kim S, Hamaguchi A, Yukimura T, Miura K, Takaori K, Iwao H. Role of angiotensin II in extracellular matrix and transforming growth factor-beta 1 expression in hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 1994;269:115-119.
275. Brilla CG. Regression of myocardial fibrosis in hypertensive heart disease: diverse effects of various antihypertensive drugs. *Cardiovasc Res.* 2000;46:324-331.
276. Taniyama Y, Morishita R, Nakagami H, Moriguchi A, Sakonjo H, Shokei K, Matsumoto K, Nakamura T, Higaki J, Ogihara T. Potential contribution of a novel antifibrotic factor, hepatocyte growth factor, to prevention of myocardial fibrosis by angiotensin II blockade in cardiomyopathic hamsters. *Circulation.* 2000;102:246-252.
277. Hahn AW, Jonas U, Buhler FR, Resink TJ. Activation of human peripheral monocytes by angiotensin II. *FEBS Lett.* 1994;347:178-180.

278. Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, Laursen JB, Hammes CP, Alexander RW, Harrison DG, Medford RM. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation*. 1999;100:1223-1229.
279. Grafe M, Auch-Schwelk W, Zakrzewicz A, Regitz-Zagrosek V, Bartsch P, Graf K, Loebe M, Gahtgens P, Fleck E. Angiotensin II-induced leukocyte adhesion on human coronary endothelial cells is mediated by E-selectin. *Circ Res*. 1997;81:804-811.
280. Pastore L, Tessitore A, Martinotti S, Toniato E, Alesse E, Bravi MC, Ferri C, Desideri G, Gulino A, Santucci A. Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by human vascular endothelial cells and increases soluble ICAM-1 release in vivo. *Circulation*. 1999;100:1646-1652.
281. Tayeh MA, Scicli AG. Angiotensin II and bradykinin regulate the expression of P-selectin on the surface of endothelial cells in culture. *Proc Assoc Am Physicians*. 1998;110:412-421.
282. Ackermann A, Fernandez-Alfonso MS, Sanchez de Rojas R, Ortega T, Paul M, Gonzalez C. Modulation of angiotensin-converting enzyme by nitric oxide. *Br J Pharmacol*. 1998;124:291-298.
283. Hutchinson HG, Hein L, Fujinaga M, Pratt RE. Modulation of vascular development and injury by angiotensin II. *Cardiovasc Res*. 1999;41:689-700.
284. Boulanger CM, Caputo L, Levy BI. Endothelial AT1-mediated release of nitric oxide decreases angiotensin II contractions in rat carotid artery. *Hypertension*. 1995;26:752-757.
285. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000;87:840-844.

286. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1994;74:1141-1148.
287. Touyz RM, Schiffrin EL. Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 1999;34:976-982.
288. Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griendling KK. p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem*. 1998;273:15022-15029.
289. Touyz RM, Schiffrin EL. Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. *J Hypertens*. 2001;19:1245-1254.
290. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*. 1996;97:1916-1923.
291. Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1996;271:23317-23321.
292. Touyz RM, Yao G, Schiffrin EL. c-Src Induces Phosphorylation and Translocation of p47phox. Role in Superoxide Generation by Angiotensin II in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003.
293. von Harsdorf R, Li PF, Dietz R. Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation*. 1999;99:2934-2941.

294. Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. Superoxide induces apoptosis in cardiomyocytes, but proliferation and expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts. *FEBS Lett.* 1999;448:206-210.
295. Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res.* 1992;70:593-599.
296. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 2000;86:494-501.
297. Burdon RH, Gill V, Rice-Evans C. Oxidative stress and tumour cell proliferation. *Free Radic Res Commun.* 1990;11:65-76.
298. Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation.* 1997;96:3602-3609.
299. Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, Taylor WR, Griendling KK. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension.* 1998;32:488-495.
300. Porreca E, Di Febbo C, Pandolfi A, D'Orazio A, Martelli N, Mezzetti A, Cuccurullo F, Poggi A. Differences in the glutathione system of cultured aortic smooth muscle cells from young and aged rats. *Atherosclerosis.* 1993;100:141-148.
301. Khan S, Kayahara M, Joashi U, Mazarakis ND, Sarraf C, Edwards AD, Hughes MN, Mehmet H. Differential induction of apoptosis in Swiss 3T3 cells by nitric oxide and the nitrosonium cation. *J Cell Sci.* 1997;110 (Pt 18):2315-2322.
302. Fukuo K, Hata S, Suhara T, Nakahashi T, Shinto Y, Tsujimoto Y, Morimoto S, Ogihara T. Nitric oxide induces upregulation of Fas and apoptosis in vascular smooth muscle. *Hypertension.* 1996;27:823-826.
303. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of

- cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1989;83:1774-1777.
304. Shin JT, Barbeito L, MacMillan-Crow LA, Beckman JS, Thompson JA. Acidic fibroblast growth factor enhances peroxynitrite-induced apoptosis in primary murine fibroblasts. *Arch Biochem Biophys.* 1996;335:32-41.
305. Peters SL, Mathy MJ, Pfaffendorf M, van Zwieten PA. Reactive oxygen species-induced aortic vasoconstriction and deterioration of functional integrity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000;361:127-133.
306. Walia M, Sormaz L, Samson SE, Lee RM, Grover AK. Effects of hydrogen peroxide on pig coronary artery endothelium. *Eur J Pharmacol.* 2000;400:249-253.
307. Cosentino F, Sill JC, Katusic ZS. Role of superoxide anions in the mediation of endothelium-dependent contractions. *Hypertension.* 1994;23:229-235.
308. Chang KC, Chung SY, Chong WS, Suh JS, Kim SH, Noh HK, Seong BW, Ko HJ, Chun KW. Possible superoxide radical-induced alteration of vascular reactivity in aortas from streptozotocin-treated rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993;266:992-1000.
309. White CR, Brock TA, Chang LY, Crapo J, Briscoe P, Ku D, Bradley WA, Gianturco SH, Gore J, Freeman BA, et al. Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:1044-1048.
310. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:1620-1624.
311. Ballinger SW, Patterson C, Yan CN, Doan R, Burow DL, Young CG, Yakes FM, Van Houten B, Ballinger CA, Freeman BA, Runge MS. Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ Res.* 2000;86:960-966.

312. Chin JH, Azhar S, Hoffman BB. Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized lipoproteins. *J Clin Invest.* 1992;89:10-18.
313. Keidar S, Attias J. Angiotensin II injection into mice increases the uptake of oxidized LDL by their macrophages via a proteoglycan-mediated pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;239:63-67.
314. Daugherty A, Manning MW, Cassis LA. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest.* 2000;105:1605-1612.
315. Erdos EG, Skidgel RA. The angiotensin I-converting enzyme. *Lab Invest.* 1987;56:345-348.
316. Regoli D, Barabe J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev.* 1980;32:1-46.
317. Stein JH, Congbalay RC, Karsh DL, Osgood RW, Ferris TF. The effect of bradykinin on proximal tubular sodium reabsorption in the dog: evidence for functional nephron heterogeneity. *J Clin Invest.* 1972;51:1709-1721.
318. Duke RC, Ojcius DM, Young JD. Cell suicide in health and disease. *Sci Am.* 1996;275.
319. Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell.* 1997;88.
320. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995;267:1456-1462.
321. Tenniswood M, Taillefer D, Lakins J, al. e. Control of gene expression during apoptosis in hormone-dependent tissues. In: Tomei LD, Cope FO, eds. *Apoptosis II: The molecular basis of apoptosis in disease.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1994:283-311.
322. Vaux DL. Caspases and apoptosis - biology and terminology. *Cell Death Differ.* 1999;6:493-494.
323. Kajstura J, Mansukhani M, Cheng W, Reiss K, Krajewski S, Reed JC, Quaini F, Sonnenblick EH, Anversa P. Programmed cell death and

- expression of the protooncogene bcl-2 in myocytes during postnatal maturation of the heart. *Exp Cell Res.* 1995;219:110-121.
324. James TN. Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. From postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias. *Circulation.* 1994;90:556-573.
 325. Kajstura J, Cheng W, Sarangarajan R, Li P, Li B, Nitahara JA, Chapnick S, Reiss K, Olivetti G, Anversa P. Necrotic and apoptotic myocyte cell death in the aging heart of Fischer 344 rats. *Am J Physiol.* 1996;271:H1215-1228.
 326. Yeh ET. Life and death in the cardiovascular system. *Circulation.* 1997;95:782-786.
 327. Anversa P. Myocyte death in the pathological heart. *Circ Res.* 2000;86:121-124.
 328. Diez J, Fortuno MA, Ravassa S. Apoptosis in hypertensive heart disease. *Curr Opin Cardiol.* 1998;13:317-325.
 329. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995;267:1456-1462.
 330. Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metast Rev.* 1992;11:95-103.
 331. Teiger E, Than VD, Richard L, Wisnewsky C, Tea BS, Gaboury L, Tremblay J, Schwartz K, Hamet P. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest.* 1996;97:2891-2897.
 332. Wyllie AH. The biology of cell death in tumours. *Anticancer Res.* 1985;5:131-136.
 333. Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol.* 1991;32:223-254.
 334. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26:239-257.

- 335. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 1995;146:3-15.
- 336. Murgia M, Pizzo P, Sandona D, Zanovello P, Rizzuto R, Di Virgilio F. Mitochondrial DNA is not fragmented during apoptosis. *J Biol Chem.* 1992;267:10939-10941.
- 337. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980;68:251-306.
- 338. Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today.* 1993;14:131-136.
- 339. Piacentini M, Davies PJA, Fesus L. Tissue transglutaminase in cells undergoing apoptosis. In: Tomei LD, Cope FO, eds. *Apoptosis II: The molecular basis of apoptosis in disease.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1994:143-163.
- 340. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *TIBS.* 1997;22:299-306.
- 341. Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, Morris ID, Hickman JA, Wakeling AE, Walker PR, Sikorska M. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *Embo J.* 1993;12:3679-3684.
- 342. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998;281:1305-1308.
- 343. Baker SJ, Reddy EP. Modulation of life and death by TNF receptor superfamily. *Oncogene.* 1998;17:3261-3270.
- 344. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell.* 1997;88:355-365.
- 345. Orlinick JR, Vaishnaw AK, Elkon KB. Structure and function of Fas/Fas ligand. *Int Rev Immunol.* 1999;18:293-308.
- 346. Fraser A, Evan G. A license to kill. *Cell.* 1996;85:781-784.
- 347. Lehtonen JY, Horiuchi M, Daviet L, Akishita M, Dzau VJ. Activation of the de novo biosynthesis of sphingolipids mediates angiotensin II type 2 receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1999;274:16901-16906.

348. Gallinat S, Busche S, Schutze S, Kronke M, Unger T. AT2 receptor stimulation induces generation of ceramides in PC12W cells. *FEBS Lett.* 1999;443:75-79.
349. Mignon A, Riouquet N, Joulin V. Les caspases, les protéases à cystéine de l'apoptose: un enjeu thérapeutique pour demain? *Médecine/Sciences.* 1998;14:9-17.
350. Mignotte B, Zamzami N, Petit P, Vayssière J-L, Kroemer G. Contrôle mitochondrial de l'apoptose: la mort cellulaire programmée est-elle apparue à la suite de l'événement endosymbiotique à l'origine des mitochondries? *Médecine/Sciences.* 1998;14:54-60.
351. Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med.* 1997;3:614-620.
352. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997;91:479-489.
353. Sun X-M, MacFarlane M, Zhuang J, Wolf BB, Green DR, Cohen GM. Distinct caspase cascade are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1999;274:5053-5060.
354. Lee D, Long SA, Adams JL, Chan G, Vaidya KS, Francis TA, Kikly K, Winkler JD, Sung CM, Debouck C, Richardson S, Levy MA, DeWolf WE, Jr., Keller PM, Tomaszek T, Head MS, Ryan MD, Haltiwanger RC, Liang PH, Janson CA, McDevitt PJ, Johanson K, Concha NO, Chan W, Abdel-Meguid SS, Badger AM, Lark MW, Nadeau DP, Suva LJ, Gowen M, Nuttall ME. Potent and selective nonpeptide inhibitors of caspases 3 and 7 inhibit apoptosis and maintain cell functionality. *J Biol Chem.* 2000;275:16007-16014.
355. Nuttall ME, Lee D, McLaughlin B, Erhardt JA. Selective inhibitors of apoptotic caspases: implications for novel therapeutic strategies. *Drug Discov Today.* 2001;6:85-91.

356. Bump NJ, Hackett M, Hugunin M, Seshagiri S, Brady K, Chen P, Ferenz C, Franklin S, Ghayur T, Li P, al. e. Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science*. 1995;269:1885-1888.
357. Xue D, Horvitz HR. Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell-death protease CED-3, by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. *Nature*. 1995;377:248-251.
358. Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell*. 1994;79:189-192.
359. Kluck RM, Bossy-Weitzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. 1997;275:1132-1136.
360. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 1996;86:147-157.
361. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked [see comments]. *Science*. 1997;275:1129-1132.
362. Wyllie AH. Apoptosis. An endonuclease at last [new; comment]. *Nature*. 1998;391:20-21.
363. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*. 1998;391:96-99.
364. Kockx MM, Muhring J, Knaapen MW, de Meyer GR. RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. *Am J Pathol*. 1998;152:885-888.
365. Kano M, Takemura G, Misao J, Hayakawa Y, Aoyama T, Nishigaki K, Noda T, Fujiwara T, Fukuda K, Minatoguchi S, Fujiwara H. Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy: not apoptosis but DNA repair. *Circulation*. 1999;99:2757-2764.

366. Bonnefoy-Berard N, Genestier L, Flacher M, Revillard JP. The phosphoprotein phosphatase calcineurin controls calcium-dependent apoptosis in B cell lines. *Eur J Immunol.* 1994;24:325-329.
367. Bayly AC, Roberts RA, Dive C. Suppression of liver cell apoptosis in vitro by the non-genotoxic hepatocarcinogen and peroxisome proliferator nafenopin. *J Cell Biol.* 1994;125:197-203.
368. Falk MH, Hultner L, Milner A, Gregory CD, Bornkamm GW. Irradiated fibroblasts protect Burkitt lymphoma cells from apoptosis by a mechanism independent of bcl-2. *Int J Cancer.* 1993;55:485-491.
369. Oyaizu N, McCloskey TW, Coronese M, Chirmule N, Kalyanaraman VS, Pahwa S. Accelerated apoptosis in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from human immunodeficiency virus type-1 infected patients and in CD4 cross-linked PBMCs from normal individuals. *Blood.* 1993;82:3392-3400.
370. Hotz MA, Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Flow cytometric detection of apoptosis: comparison of the assays of in situ DNA degradation and chromatin changes. *Cytometry.* 1994;15:237-244.
371. Endres M, Namura S, Shimizu-Sasamata M, Waeber C, Zhang L, Gomez-Isla T, Hyman BT, Moskowitz MA. Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998;18:238-247.
372. Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation.* 1998;97:276-281.
373. Rodriguez I, Matsuura K, Ody C, Nagata S, Vassalli P. Systemic injection of a tripeptide inhibits the intracellular activation of CPP32-like proteases in vivo and fully protects mice against Fas-mediated fulminant liver destruction and death. *J Exp Med.* 1996;184:2067-2072.
374. Hamet P. Proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1995;4:1-7.

375. Liu JJ, Peng L, Bradley CJ, Zulli A, Shen J, Buxton BF. Increased apoptosis in the heart of genetic hypertension, associated with increased fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 2000;45:729-735.
376. Rizzoni D, Rodella L, Porteri E, Rezzani R, Guelfi D, Piccoli A, Castellano M, Muiesan ML, Bianchi R, Rosei EA. Time course of apoptosis in small resistance arteries of spontaneously hypertensive rats [In Process Citation]. *J Hypertens.* 2000;18:885-891.
377. Devlin AM, Clark JS, Reid JL, Dominiczak AF. DNA synthesis and apoptosis in smooth muscle cells from a model of genetic hypertension [In Process Citation]. *Hypertension.* 2000;36:110-115.
378. Hamet P, Thorin-Trescases N, Moreau P, Dumas P, Tea BS, deBlois D, Kren V, Pravenec M, Kunes J, Sun Y, Tremblay J. Workshop: excess growth and apoptosis: is hypertension a case of accelerated aging of cardiovascular cells? *Hypertension.* 2001;37:760-766.
379. Moreau P, Tea BS, Dam TV, Hamet P. Altered balance between cell replication and apoptosis in hearts and kidneys of newborn SHR. *Hypertension.* 1997;30:720-724.
380. Xu C, Lee S, Singh TM, Sho E, Li X, Sho M, Masuda H, Zarins CK. Molecular mechanisms of aortic wall remodeling in response to hypertension. *J Vasc Surg.* 2001;33:570-578.
381. Sharifi AM, Schiffrin EL. Apoptosis in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats: effect of endothelin receptor antagonism. *J Hypertens.* 1997;15:1441-1448.
382. Walter SV, Hamet P. Enhanced DNA synthesis in heart and kidney of newborn spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1986;8:520-525.
383. Cigola E, Kajstura J, Li B, Meggs LG, Anversa P. Angiotensin II activates programmed myocyte cell death in vitro. *Exp Cell Res.* 1997;231:363-371.
384. Li Z, Bing OH, Long X, Robinson KG, Lakatta EG. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol.* 1997;272:H2313-2319.

385. Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res.* 1993;73:413-423.
386. Brilla CG, Matsubara L, Weber KT. Advanced hypertensive heart disease in spontaneously hypertensive rats. Lisinopril-mediated regression of myocardial fibrosis. *Hypertension.* 1996;28:269-275.
387. Weber KT. Fibrosis and hypertensive heart disease. *Curr Opin Cardiol.* 2000;15:264-272.
388. Leri A, Claudio PP, Li Q, Wang X, Reiss K, Wang S, Malhotra A, Kajstura J, Anversa P. Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the Bcl-2-to-Bax protein ratio in the cell. *J Clin Invest.* 1998;101:1326-1342.
389. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3:349-363.
390. Frangogiannis NG, Michael LH, Entman ML. Myofibroblasts in reperfused myocardial infarcts express the embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb). *Cardiovasc Res.* 2000;48:89-100.
391. Campbell SE, Janicki JS, Weber KT. Temporal differences in fibroblast proliferation and phenotype expression in response to chronic administration of angiotensin II or aldosterone. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27:1545-1560.
392. Stockand JD, Meszaros JG. Aldosterone stimulates proliferation of cardiac fibroblasts by activating Ki-RasA and MAPK1/2 signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284:H176-184.
393. Weber KT, Sun Y. Recrutable ACE and tissue repair in the infarcted heart. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2000;1:295-303.

394. Sun Y, Weber KT. Angiotensin converting enzyme and myofibroblasts during tissue repair in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28:851-858.
395. Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1). *Mol Genet Metab.* 2000;71:418-435.
396. Petrov VV, Fagard RH, Lijnen PJ. Transforming growth factor-beta(1) induces angiotensin-converting enzyme synthesis in rat cardiac fibroblasts during their differentiation to myofibroblasts. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2000;1:342-352.
397. Shanahan CM, Weissberg PL. Smooth muscle cell heterogeneity: patterns of gene expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:333-338.
398. Bascands JL, Girolami JP, Trolly M, Escargueil-Blanc I, Nazzal D, Salvayre R, Blaes N. Angiotensin II induces phenotype-dependent apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 2001;38:1294-1299.
399. Di Leonardo A, Khan SH, Linke SP, Greco V, Seidita G, Wahl GM. DNA rereplication in the presence of mitotic spindle inhibitors in human and mouse fibroblasts lacking either p53 or pRb function. *Cancer Res.* 1997;57:1013-1019.
400. Tea BS, Dam TV, Moreau P, Hamet P, deBlois D. Apoptosis during regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. Temporal regulation and spatial heterogeneity. *Hypertension.* 1999;34:229-235.
401. Orlov SN, Tremblay J, DeBlois D, Hamet P. Genetics of programmed cell death and proliferation. *Semin Nephrol.* 2002;22:161-171.
402. Figueredo VM, Brandes R, Weiner MW, Massie BM, Camacho SA. Endocardial versus epicardial differences of intracellular free calcium under normal and ischemic conditions in perfused rat hearts. *Circ Res.* 1993;72:1082-1090.

403. Cook SJ, Chamunorwa JP, Lancaster MK, O'Neill SC. Regional differences in the regulation of intracellular sodium and in action potential configuration in rabbit left ventricle. *Pflugers Arch.* 1997;433:515-522.
404. Clark RB, Bouchard RA, Salinas-Stefanon E, Sanchez-Chapula J, Giles WR. Heterogeneity of action potential waveforms and potassium currents in rat ventricle. *Cardiovasc Res.* 1993;27:1795-1799.
405. Lukas A, Antzelevitch C. Differences in the electrophysiological response of canine ventricular epicardium and endocardium to ischemia. Role of the transient outward current. *Circulation.* 1993;88:2903-2915.
406. Miyoshi S, Miyazaki T, Moritani K, Ogawa S. Different responses of epicardium and endocardium to KATP channel modulators during regional ischemia. *Am J Physiol.* 1996;271:H140-147.
407. Yang ZK, Boyett MR, Janvier NC, McMorn SO, Shui Z, Karim F. Regional differences in the negative inotropic effect of acetylcholine within the canine ventricle. *J Physiol.* 1996;492 (Pt 3):789-806.
408. MacGowan GA, Shapiro EP, Azhari H, Siu CO, Hees PS, Hutchins GM, Weiss JL, Rademakers FE. Noninvasive measurement of shortening in the fiber and cross-fiber directions in the normal human left ventricle and in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 1997;96:535-541.
409. Palmon LC, Reichel N, Yeon SB, Clark NR, Brownson D, Hoffman E, Axel L. Intramural myocardial shortening in hypertensive left ventricular hypertrophy with normal pump function. *Circulation.* 1994;89:122-131.
410. Harada M, Itoh H, Nakagawa O, Ogawa Y, Miyamoto Y, Kuwahara K, Ogawa E, Igaki T, Yamashita J, Masuda I, Yoshimasa T, Tanaka I, Saito Y, Nakao K. Significance of ventricular myocytes and nonmyocytes interaction during cardiocyte hypertrophy: evidence for endothelin-1 as a paracrine hypertrophic factor from cardiac nonmyocytes. *Circulation.* 1997;96:3737-3744.
411. Rul W, Zugasti O, Roux P, Peyssonnaud C, Eyche A, Franke TF, Lenormand P, Fort P, Hibner U. Activation of ERK, controlled by Rac1

and Cdc42 via Akt, is required for anoikis. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;973:145-148.

412. Ishida K, Nagahara H, Kogiso T, Aso T, Hayashi N, Akaike T. Cell adhesion aside from integrin system can abrogate anoikis in rat liver cells by down-regulation of FasL expression, not by activation of PI-3K/Akt and ERK signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;300:201-208.
413. Stupack DG, Puente XS, Boutsaboualoy S, Storgard CM, Cheresch DA. Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol.* 2001;155:459-470.
414. Viswanathan M, Tsutsumi K, Correa FMA, Saavedra JM. Changes in expression of angiotensin receptor subtypes in the rat aorta during development. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1991;179:1361-1367.
415. Brunner HR, Christen Y, Munafo A, Lee RJ, Waeber B, Nussberger J. Clinical experience with angiotensin II receptor antagonists. *Am J Hypertens.* 1992;5:243S-246S.
416. Bernstein KE, Alexander RW. Counterpoint: molecular analysis of the angiotensin II receptor. *Endocr Rev.* 1992;13:381-386.
417. Lu D, Raizada MK. Delivery of angiotensin II type 1 receptor antisense inhibits angiotensin action in neurons from hypertensive rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:2914-2918.
418. Santos R, Brosnihan K, Chappell M, Pesquero J, Chernicky C, Greene L, Ferrario C. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension.* 1988;11:153-157.
419. Oliveira M, Fortes Z, Santos R, Khosla M, Carvalho M. Synergistic effect of angiotensin-(1-7) on bradykinin induced vasodilation on rat mesenteric microvessels in vivo. *Peptides.* 1999;20:1195-1201.
420. Brosnihan K, Li P, Ferrario C. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension.* 1996;27:523-528.

421. Paula R, Lima C, Khosla M, Santos R. Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats. *Hypertension*. 1995;26:1154-1159.
422. Lima C, Paula R, Resende F, Khosla M, Santos R. Potentiation of the hypotensive effect of bradykinin by short-term infusion of angiotensin-(1-7) in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*. 1997;30(pt2):542-548.
423. Candipan RC, Wang BY, Buitrago R, Tsao PS, Cooke JP. Regression or progression. Dependency on vascular nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:44-50.
424. Wang BY, Ho HK, Lin PS, Schwarzscher SP, Pollman MJ, Gibbons GH, Tsao PS, Cooke JP. Regression of atherosclerosis: role of nitric oxide and apoptosis. *Circulation*. 1999;99:1236-1241.
425. Erdos EG. The angiotensin I converting enzyme. *Fed Proc*. 1977;36:1760-1765.
426. Berthiaume N, Hess F, Chen A, Regoli D, D'Orleans-Juste P. Pharmacology of kinins in the arterial and venous mesenteric bed of normal and B2 knockout transgenic mice. *Eur J Pharmacol*. 1997;333:55-61.
427. Benetos A, Levy BI, Lacolley P, Taillard F, Duriez M, Safar ME. Role of angiotensin II and bradykinin on aortic collagen following converting enzyme inhibition in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:3196-3201.
428. Harrap SB, O'Sullivan JB. Cardiac transplantation, perindopril, and left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1996;28:622-626.
429. Linz W, Scholkens BA. A specific B2-bradykinin receptor antagonist HOE 140 abolishes the antihypertrophic effect of ramipril. *Br J Pharmacol*. 1992;105:771-772.

430. Marceau F, Bachvarov DR. Kinin receptors. *Clin Rev Allergy Immunol*. 1998;16:385-401.
431. Marin-Castano ME, Schanstra JP, Neau E, Praddaude F, Pecher C, Ader JL, Girolami JP, Bascands JL. Induction of functional bradykinin b(1)-receptors in normotensive rats and mice under chronic Angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment. *Circulation*. 2002;105:627-632.
432. Ignjatovic T, Tan F, Brovkovich V, Skidgel RA, Erdos EG. Novel mode of action of angiotensin I converting enzyme inhibitors: direct activation of bradykinin B1 receptor. *J Biol Chem*. 2002;277:16847-16852.
433. Ignjatovic T, Tan F, Brovkovich V, Skidgel RA, Erdos EG. Activation of bradykinin B1 receptor by ACE inhibitors. *Int Immunopharmacol*. 2002;2:1787-1793.
434. Wang C, Chao L, Chao J. Direct gene delivery of human tissue kallikrein reduces blood pressure in spontaneously hypertensive rats [see comments]. *J Clin Invest*. 1995;95:1710-1716.
435. Xiong W, Chao J, Chao L. Muscle delivery of human kallikrein gene reduces blood pressure in hypertensive rats. *Hypertension*. 1995;25:715-719.
436. Marchand EL, Der Sarkissian S, Hamet P, DeBlois D. Caspase-Dependent Cell Death Mediates the Early Phase of Aortic Hypertrophy Regression in Losartan-Treated Spontaneously Hypertensive Rats. *Circ Res*. 2003.
437. Rhaleb NE, Peng H, Harding P, Tayeh M, LaPointe MC, Carretero OA. Effect of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline on DNA and collagen synthesis in rat cardiac fibroblasts. *Hypertension*. 2001;37:827-832.
438. Peng H, Carretero OA, Raji L, Yang F, Kapke A, Rhaleb NE. Antifibrotic effects of N-acetyl-seryl-aspartyl-Lysyl-proline on the heart and kidney in aldosterone-salt hypertensive rats. *Hypertension*. 2001;37:794-800.
439. Pasquale PD, Stefano GD, Paterna S. Mineralocorticoids and cardiovascular diseases. Status of knowledge from experimental and clinical studies. *Ital Heart J*. 2000;1:595-604.

440. Benetos A, Lacolley P, Safar ME. Prevention of aortic fibrosis by spironolactone in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1152-1156.
441. De Angelis N, Fiordaliso F, Latini R, Calvillo L, Funicello M, Gobbi M, Mennini T, Masson S. Appraisal of the Role of Angiotensin II and Aldosterone in Ventricular Myocyte Apoptosis in Adult Normotensive Rat. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34:1655-1665.
442. Tsutsumi Y, Matsubara H, Ohkubo N, Mori Y, Nozawa Y, Murasawa S, Kijima K, Maruyama K, Masaki H, Moriguchi Y, Shibasaki Y, Kamihata H, Inada M, Iwasaka T. Angiotensin II type 2 receptor is upregulated in human heart with interstitial fibrosis, and cardiac fibroblasts are the major cell type for its expression. *Circ Res.* 1998;83:1035-1046.
443. Schiffrin EL. Vascular and cardiac benefits of angiotensin receptor blockers. *Am J Med.* 2002;113:409-418.
444. Lindholm LH, Ibsen H, Dahlof B, Devereux RB, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Julius S, Kjeldsen SE, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H, Aurup P, Edelman J, Snapinn S. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet.* 2002;359:1004-1010.
445. Dahlof B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet.* 2002;359:995-1003.
446. Julius S. Long-term potential of angiotensin receptor blockade for cardiovascular protection in hypertension: the VALUE trial. Valsartan

- Antihypertensive Long-term Use Evaluation. *Cardiology*. 1999;91 Suppl 1:8-13.
447. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. 2000;342:145-153.
 448. Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions. The SOLVD Investigators. *N Engl J Med*. 1992;327:685-691.
 449. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. The SOLVD Investigators. *N Engl J Med*. 1991;325:293-302.
 450. Pitt B, Poole-Wilson PA, Segal R, Martinez FA, Dickstein K, Camm AJ, Konstam MA, Riegger G, Klinger GH, Neaton J, Sharma D, Thiyagarajan B. Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomised trial--the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II. *Lancet*. 2000;355:1582-1587.
 451. Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, Basta L, Brown EJ, Jr., Cuddy TE, Davis BR, Geltman EM, Goldman S, Flaker GC, et al. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med*. 1992;327:669-677.
 452. Effect of ramipril on mortality and morbidity of survivors of acute myocardial infarction with clinical evidence of heart failure. The Acute Infarction Ramipril Efficacy (AIRE) Study Investigators. *Lancet*. 1993;342:821-828.
 453. Dickstein K, Kjekshtus J. Comparison of the effects of losartan and captopril on mortality in patients after acute myocardial infarction: the

- OPTIMAAL trial design. Optimal Therapy in Myocardial Infarction with the Angiotensin II Antagonist Losartan. *Am J Cardiol*. 1999;83:477-481.
454. Pfeffer MA, McMurray J, Leizorovicz A, Maggioni AP, Rouleau JL, Van De Werf F, Henis M, Neuhart E, Gallo P, Edwards S, Sellers MA, Velazquez E, Califf R. Valsartan in acute myocardial infarction trial (VALIANT): rationale and design. *Am Heart J*. 2000;140:727-750.
455. Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic: The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *Jama*. 2002;288:2981-2997.
456. Loging JA, New RB, Baicu SC, King MK, Hendrick JW, Crawford FA, Jr., de Gasparo M, Spinale FG. Effects of angiotensin type-I receptor blockade on pericardial fibrosis. *J Surg Res*. 1999;87:101-107.

ANNEXE

Proapoptotic and Growth-Inhibitory Role of Angiotensin II Type 2 Receptor in Vascular Smooth Muscle Cells of Spontaneously Hypertensive Rats In Vivo

Bun-Seng Tea, Shant Der Sarkissian, Rhian M. Touyz, Pavel Hamet, Denis deBlois

Abstract—Angiotensin type 2 (AT₂) receptors for angiotensin II suppress cell growth and induce apoptosis in vitro, but their role is poorly defined in vivo. We reported that transient induction of smooth muscle cell (SMC) apoptosis precedes DNA synthesis inhibition and aortic hypertrophy regression in spontaneously hypertensive rats treated with the AT₁ antagonist losartan or the converting-enzyme inhibitor enalapril. Although both drugs are equipotent in reducing SMC number, apoptosis occurs significantly earlier with losartan than enalapril. To examine the role of AT₂ receptors in this model, spontaneously hypertensive rats were given valsartan, an AT₁ antagonist, or enalapril, in combination or not with the AT₂ antagonist PD123319 for 1 or 2 weeks. Control rats received vehicle. Systolic blood pressure was reduced similarly by valsartan and enalapril but it was not significantly affected by PD123319. Angiotensin II plasma levels were increased (6-fold) with valsartan and reduced (80%) with enalapril but unaffected by PD123319. Valsartan significantly increased internucleosomal DNA fragmentation indicative of apoptosis at 1 week only (2.7-fold) and significantly reduced aortic mass (18%), SMC number (33%), and DNA synthesis (24%, measured by ³H-thymidine incorporation) at 2 weeks. These valsartan-induced changes were prevented by PD123319. In contrast, enalapril-induced DNA fragmentation (2-fold increase at 2 weeks) was not affected by PD123319. PD123319 given alone did not affect growth or apoptosis. AT₁ and AT₂ receptor mRNAs were detected in the aorta by reverse transcription-polymerase chain reaction. Together, these results provide the first evidence that AT₂ receptors mediate vascular mass regression by stimulating SMC apoptosis in vivo, an effect seen during AT₁ receptor blockade but not during converting-enzyme inhibition. (*Hypertension*. 2000;35:1069-1073.)

Key Words: angiotensin II ■ muscle, smooth, vascular ■ losartan ■ enalapril

Two main subtypes of specific cell membrane receptors for angiotensin II (Ang II) have been pharmacologically defined and cloned, namely angiotensin type 1 (AT₁) receptors, which are blocked specifically by antagonists such as valsartan, and angiotensin type 2 (AT₂) receptors, which are blocked specifically by PD123319.¹ AT₁ receptors represent the predominant receptor subtype in the adult rat arterial wall, in which they stimulate smooth muscle cell (SMC) contraction and growth.¹ Although AT₂ receptors are predominantly expressed in SMC during fetal development, low levels of expression are found in the aorta of adult rats including spontaneously hypertensive rats (SHR).² A growing body of evidence suggests that AT₁ and AT₂ receptors elicit counterbalancing influences on the cell growth-death balance. In cultured SMC, AT₁ receptors promote growth and inhibit apoptosis, whereas AT₂ receptors elicit opposite effects.¹⁻⁴ However, AT₂ receptor regulation of SMC number by apoptosis has never been examined in vivo. Moreover, the role of AT₂ receptors in vascular remodeling in vivo is controversial.⁵⁻⁸

The regression of vascular hypertrophy is a potential therapeutic target for the reduction of complications associated with hypertension. In SHR, aortic hypertrophy is associated with increased vascular mass and DNA content.^{9,10} SHR SMC show enhanced growth in vitro and in vivo^{10,11} and an increased propensity to undergo apoptosis in response to growth factor withdrawal in vitro.¹² Recently, we reported that blockade of the Ang II pathway in SHR induces a transient increase in aortic SMC apoptosis at the onset of vascular hypertrophy regression, an effect that is not secondary to blood pressure reduction.¹³ Although the AT₁ receptor antagonist losartan and the angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor enalapril are equipotent in reducing SMC number in the SHR aorta, SMC apoptosis occurs significantly earlier with losartan (at 1 week) than with enalapril (at 2 weeks).¹³ Inhibition of SMC DNA synthesis is also observed, but it is sustained and temporally dissociated because it occurs after the early time window of SMC apoptosis. AT₁ receptor blockade in vivo increases Ang II plasma levels¹⁴

Received November 22, 1999; first decision December 8, 1999; revision accepted December 17, 1999.

From the Centre de Recherche, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) (B.-S. T., S.D.S., P.H., D.D.), Montreal, Quebec, Canada, and The Clinical Research Institute of Montreal (R.M.T.).

Correspondence to Denis deBlois, Centre de Recherche, CHUM-Hôtel-Dieu, 3840 St Urbain St, Room 7-132B, Montreal, Quebec H2W 1T8, Canada. E-mail [redacted]

© 2000 American Heart Association, Inc.

Hypertension is available at <http://www.hypertensionaha.org>

and allows unopposed activation of AT₂ receptors, whereas suppression of Ang II production by ACE inhibitors reduces activation of both AT₁ and AT₂ receptors. Thus, we hypothesized that Ang II acting through AT₂ receptors may be involved in SMC apoptosis stimulation in response to AT₁ receptor blockade but not in response to ACE inhibition. To the best of our knowledge, this is the first report of AT₂ receptor-dependent cell deletion by apoptosis in the cardiovascular system in vivo.

Methods

Nine- to 10-week-old male SHR were purchased from Charles River (St Constant, Canada) and housed for ≥ 10 days before study. Food and water were administered ad libitum. Rats ($n=5$ to 8 per group) were treated for 1 to 2 weeks with the selective AT₁ antagonist valsartan (30 mg/kg per day; gift of Novartis, Toronto, Canada) in the drinking water, the selective AT₂ antagonist PD123319 (30 mg/kg per day; gift of Parke-Davis, Ann Arbor, Mich) by continuous subcutaneous infusion with an osmotic minipump (Alzet, model 4 ML1 or 4 ML2), or a combination of both drugs. PD123319 was dissolved in saline (pH 3.0, adjusted with 0.1 mol/L sodium citrate). A subgroup of rats received enalapril (30 mg/kg per day PO, Sigma Chemical Co) in combination or not with PD123319 for 2 weeks. Control animals received vehicle. All animal manipulations were conducted according to institutional guidelines.

Systolic blood pressure was determined in conscious, restrained rats by the tail-cuff method as we described previously.¹³ Rats were killed, and the aorta media was prepared for the following measurements as we described previously¹³: vascular cross-sectional area, SMC number (using the 3-dimensional dissector method), DNA synthesis (in vivo ³H-thymidine incorporation into DNA during the last 2 hours before death), and the oligonucleosomal DNA fragmentation index (indicative of apoptosis). To examine aortic gene expression for AT₁ and AT₂ receptors, 4 untreated SHR were killed, and the thoracic aortas were isolated, dissected, and cut longitudinally into 2 halves. One half was immediately frozen; the other was denuded of endothelium as described above before freezing. Total mRNA was extracted, and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used as we described previously,¹⁵ with minor modifications. Briefly, RT was performed in a reaction volume of 30 μ L containing 4.55 μ g RNA, 1.5 μ L of 10 mmol/L dNTP, 6 μ L of BRL 5 \times buffer, 0.6 μ L Oligo (dT)₁₂₋₁₈ primer (0.5 μ g/ μ L), 1.5 μ L of 200 U/ μ L M-MLVRT, 0.9 μ L rRNasin (RNase inhibitor) 40 U/ μ L, and 3 μ L of DTT 0.1 mol/L at 37°C for 1 hour. The reaction was inactivated at 95°C for 5 minutes. After first-strand synthesis of RNA, 2 μ L cDNA was amplified with specific primers as described previously.¹⁵ The amplification profile involved denaturation at 95°C for 60 seconds, annealing at 57°C for 60 seconds, and extension at 72°C for 60 seconds for 30 cycles. After amplification, PCR products were electrophoresed on a 1.5% agarose gel for 1 hour at 9 V/cm gel. Bands corresponding to RT-PCR products were visualized by UV light after agarose gel electrophoresis, and their intensities were measured by densitometry.

Statistics

Values are presented as mean \pm SEM. Data from treated groups were compared with those of the control group by ANOVA and an unpaired Student's *t* test with Bonferroni correction for multiple comparisons. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Expression of mRNA of both AT₁ and AT₂ receptors was evident in denuded aorta, suggesting that both receptor subtypes are expressed in aortic SMC (Figure 1). The nondenuded aorta showed similar levels of AT₁ receptor expression as compared with the denuded vessel but a

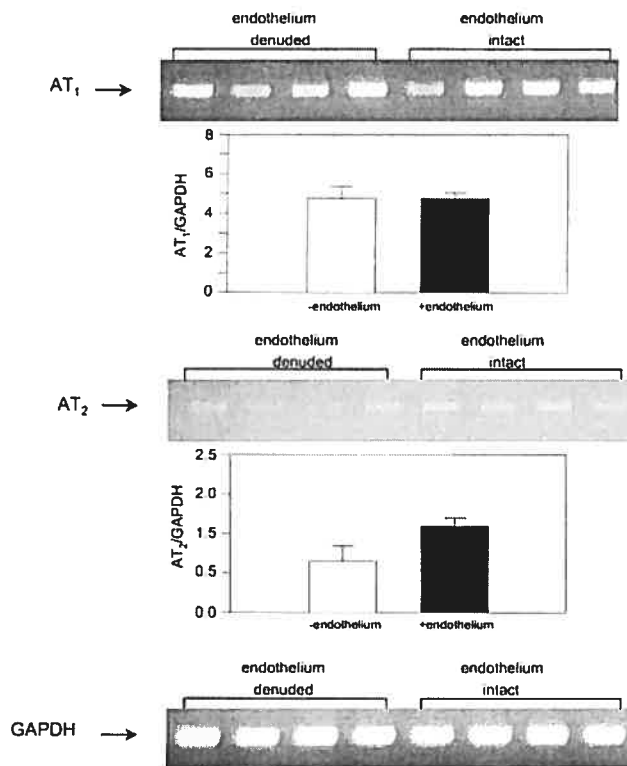


Figure 1. Detection of AT₁ and AT₂ mRNAs by RT-PCR in endothelium-denuded and endothelium-intact aorta from untreated SHR ($n=4$). Bar graphs represent mean \pm SEM. GAPDH mRNA is internal control. Amount of AT₁ and AT₂ mRNA was measured by scanning and is expressed as ratio of optical density of AT receptor mRNA to GAPDH mRNA.

tendency toward higher levels of AT₂ receptor expression, possibly caused by the presence of endothelium.

Study With Valsartan

In rats treated with valsartan alone, high blood pressure was significantly reduced after 1 and 2 weeks (170 ± 3 and 164 ± 3 mm Hg, respectively) as compared with control animals (191 ± 3 and 189 ± 4 mm Hg, respectively). Cotreatment with PD123319 did not affect the antihypertensive effect of valsartan (165 ± 3 mm Hg at 2 weeks). PD123319 alone did not significantly affect blood pressure (178 ± 3 mm Hg at 2 weeks). Final body weights were not significantly affected by valsartan (223 ± 10 g), PD123319 (258 ± 7 g), or valsartan+PD123319 (225 ± 10 g), as compared with control animals (245 ± 7 g). Within 2 weeks, PD123319 alone did not affect SMC DNA fragmentation (Figure 2A) and DNA synthesis (Figure 2B) or final SMC number (Figure 2C), medial cross-sectional area (Figure 2D), and aortic mass (5.24 ± 0.29 mg/mm per gram $\times 10^{-3}$ vs control values: 5.14 ± 0.17 mg/mm per gram $\times 10^{-3}$). In contrast, administration of valsartan alone significantly increased SMC DNA fragmentation (2.7-fold at 1 week only) and reduced aortic SMC number (by 33% at 2 weeks), suggesting SMC death by apoptosis. Valsartan-induced SMC apoptosis at 1 week was followed at 2 weeks by a significant reduction of SMC DNA synthesis, medial cross-sectional area, and aortic mass (18% reduction). However, coadministration of PD123319 prevented valsartan-induced changes in DNA fragmentation,

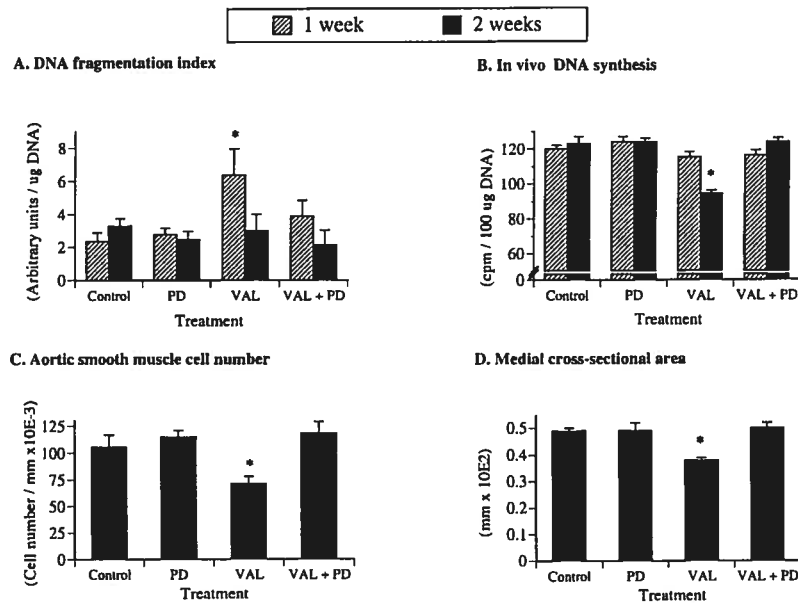


Figure 2. Changes in A, internucleosomal DNA fragmentation; B, aortic SMC DNA synthesis; C, SMC number; and D, medial hypertrophy in aorta of SHR treated for 1 or 2 weeks with valsartan (VAL), PD123319 (PD), or a combination of VAL and PD. Stimulation of DNA fragmentation and suppression of DNA synthesis induced by VAL were prevented by cotreatment with PD. Reduction in aortic SMC number and medial cross-sectional area induced by VAL were prevented by cotreatment with PD. PD given alone did not affect these parameters. *Significantly different ($P < 0.05$) from control group ($n = 5$ to 8 per group).

DNA synthesis, SMC number, medial cross-sectional area, and aortic mass (5.03 ± 0.25 mg/mm per gram $\times 10^{-3}$ at 2 weeks). The total radioactivity in aortic smooth muscle homogenates was not different between treated and untreated animals (eg, 46 ± 3 cpm/10 mg protein in the valsartan group at 2 weeks vs 50 ± 7 cpm/10 mg protein in the control group), thus ruling out differences in tissue uptake of ^3H -thymidine. Ang II plasma levels (485 ± 84 pg/mL in the control group) were increased significantly after 2 weeks in the valsartan group (2916 ± 457 pg/mL) or valsartan+PD123310 group (3195 ± 540 pg/mL). PD123319 alone did not affect Ang II levels (561 ± 76 pg/mL).

Study With Enalapril

We showed previously that SMC DNA fragmentation is increased but that DNA synthesis and aortic hypertrophy are not yet reduced after a 2-week treatment with enalapril in the SHR aorta.¹³ We examined whether coadministration of PD123319 affects the induction of SMC apoptosis at 2 weeks of enalapril therapy. Valsartan-treated rats were used as positive controls. In this study, high blood pressure was significantly and similarly reduced by enalapril (143 ± 1 mm Hg) and valsartan (144 ± 1 mm Hg) versus control animals (191 ± 2 mm Hg) at 2 weeks. The antihypertensive effect of enalapril at 2 weeks was not prevented by PD123319 cotreatment (143 ± 1 mm Hg). The significant antihypertensive effects of each treatment were also similar at 1 week (data not shown). Final body weights were not significantly affected by valsartan (275 ± 5 g), enalapril (272 ± 7 g), or enalapril+PD123319 (277 ± 13 g) as compared with control animals (270 ± 4 g). Treatment with enalapril alone caused a significant 2-fold increase in SMC DNA fragmentation (Figure 3). In contrast to valsartan, however, the enalapril-induced increase in DNA fragmentation was not prevented by coadministration of PD123319. As in our previous study,¹³ enalapril administration for 2 weeks did not reduce SMC DNA synthesis (123 ± 2 vs 127 ± 4 cpm/100 μ g in control animals), aortic DNA content (0.92 ± 0.05 vs

1.05 ± 0.06 μ g/mm in control animals), or aortic mass (4.7 ± 0.1 vs 5.2 ± 0.1 mg/mm per gram $\times 10^{-3}$ in control animals). Consistent with the data described above, valsartan administration for 2 weeks significantly reduced SMC DNA synthesis (25%), aortic DNA content (39%), and aortic mass (17%), whereas DNA fragmentation was no longer elevated at that time point. Ang II plasma levels were markedly reduced after 2 weeks of enalapril (87 ± 11 pg/mL) or enalapril+PD123319 (83 ± 13 pg/mL).

Discussion

We previously reported that losartan and enalapril are equipotent in reducing aortic SMC number in SHR.¹³ One interpretation of these results is that reduced AT₁ receptor activity with both treatments decreased SMC growth and survival. However, the effects were initiated significantly earlier with losartan than with enalapril. Because AT₁ blockade increases Ang II plasma levels,¹⁴ we hypothesized that the suppression of SMC growth-survival may involve AT₂ receptors in SHR treated with an AT₁ antagonist but not an

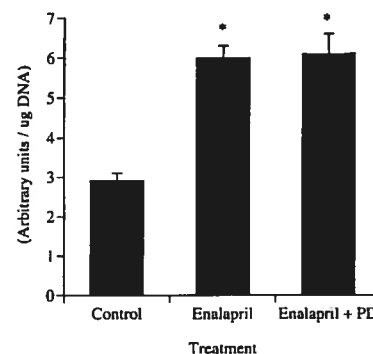


Figure 3. Changes in internucleosomal DNA fragmentation in aortic SMC in SHR treated for 2 weeks with enalapril, PD123319 (PD), or a combination of enalapril and PD. Stimulation of DNA fragmentation induced by enalapril was not prevented by cotreatment with PD. *Significantly different ($P < 0.05$) from control group ($n = 5$ per group).

ACE inhibitor. In the present study, we confirmed that mRNA for both receptor subtypes are expressed in the SHR aorta. Recently, we reported a correlation between levels of AT₁ and AT₂ receptor protein and mRNA in SHR vessels.¹⁵ Consistent with our previous findings,¹³ AT₁ receptor blockade induced a transient burst of SMC apoptosis at the onset of the regression of aortic hypertrophy and before SMC DNA replication was suppressed. In rats receiving enalapril, SMC apoptosis was stimulated at 2 weeks, but DNA synthesis and aortic hypertrophy were not yet reduced as previously shown.¹³

The significant new finding is that PD123319 blocked the proapoptotic and growth-inhibitory effects of valsartan, suggesting a role for AT₂ receptors in regulating SMC fate *in vivo*. The lack of effect of PD123319 administered alone suggests that AT₂ receptors do not elicit tonic proapoptotic or antigrowth effects on SMC under basal conditions in the aorta of young adult SHR. This is in contrast to late gestation, when SMC DNA replication is stimulated by AT₂ blockade.¹⁶ Interestingly, cotreatment with valsartan and PD123319 did not affect SMC DNA replication and apoptosis. These data suggesting that basal AT₁ and AT₂ receptor activity do not regulate SMC growth-survival are possibly related to the short treatment period examined. Alternatively, AT₁ receptors may downregulate the AT₂ pathway, which suggests that the countervailing influence of these 2 receptors is an important determinant of SMC fate. The latter interpretation is more consistent with the known role of AT₁ receptors in Ang II-dependent vascular disorders.^{1,2,17} Such a paradigm also may explain the significant antigrowth effect of AT₂ receptors in aortic SMC before birth,¹⁶ because AT₂ receptors predominate over AT₁ receptors at that time.¹⁸ Possible nonspecific effects of PD123319 cannot be ruled out. It should be mentioned, however, that the present dose of PD123319 results in plasma antagonist concentrations that are widely regarded as highly specific for AT₂ receptors (250 nmol/L).¹⁹ Ang II plasma levels were markedly elevated by valsartan but not affected by PD123319. Therefore, the simplest explanation for the present results is that AT₁ receptor blockade rapidly reduced aortic SMC accumulation by favoring Ang II-dependent AT₂ receptor activity, with proapoptotic and antigrowth consequences. Consistent with this, PD123319 did not block SMC apoptosis induced by enalapril (that is, in a model in which Ang II production was markedly reduced). That ACE inhibitors and AT₁ antagonists elicit convergent effects in part through different pathways has been documented in rat models of cardiovascular remodeling.^{20–22} In these studies, increased activity of the kinin B₂ receptor pathway has been implicated in the beneficial effects of ACE inhibitors. It should be mentioned that although both B₂ and AT₂ receptors stimulate endothelial production of nitric oxide,^{2,23} a known stimulant of SMC apoptosis,^{3,24} only ACE inhibitors prevent kinin degradation and B₂ receptor desensitization.^{25,26} These added effects may help increase SMC apoptosis with enalapril. Reduced Ang II levels during ACE inhibition may contribute further by correcting endothelial dysfunction in SHR.²⁷ In contrast, AT₂ receptors are able to stimulate SMC apoptosis independent of endothelial cells.²

Reducing arterial wall tension stimulates SMC apoptosis in rabbit vessels, suggesting that blood pressure-dependent apoptotic pathways are possible.²⁸ However, we previously reported that blood pressure reduction with hydralazine does not induce aortic SMC apoptosis in SHR.¹³ In the present study, PD123319 suppressed apoptosis, even though the antihypertensive effect of valsartan was not affected. Thus, the causal relation between blood pressure and SMC apoptosis is complex and modulated by endocrine factors. As previously observed,¹³ apoptosis induction and growth suppression were temporally dissociated during treatment. Because PD123319 blocked both events, it is not possible to determine whether growth suppression was secondary to apoptosis induction or, alternatively, a primary effect of AT₂ stimulation. That AT₂ receptors suppress growth-associated signaling pathways and ultimately DNA replication, however, is supported by several *in vitro* studies.² Previous reports have shown contrasting effects of PD123319 on vascular mass regulation *in vivo*. Some^{5–7} but not all^{8,29} groups observed that PD123319 administration for 10 weeks attenuates aortic mass in SHR or rats given long-term infusions of Ang II. None of these studies examined the balance between SMC DNA replication and apoptosis. It is known, however, that long-term Ang II infusion stimulates SMC DNA replication through AT₁ receptors.^{29,30} Interestingly, short-term Ang II infusion in normotensive rats was recently shown to induce SMC apoptotic activity through both AT₁ and AT₂ receptors, although effects on SMC number or DNA replication were not determined.³¹ In contrast, the present results clearly show that short-term treatment with PD123319 in SHR potently suppresses the induction of SMC apoptosis, the inhibition of SMC growth, and the rapid regression of SMC number and vascular mass induced by an AT₁ receptor antagonist. The discrepancies with the studies mentioned above may reflect differences in experimental models and/or schedule of drug administration. For instance, the documented suppression of endothelial cell growth by AT₂ receptors³² raises the possibility that long-term blockade of this receptor with PD123319 may alter endothelial cell behavior *in vivo*, an important determinant of vascular mass.³³ Our RT-PCR data in vessels with or without endothelium suggest that AT₂ receptors are expressed in SHR aortic endothelial cells, as previously shown in smaller rat vessels.³⁴ Thus, a role for endothelial AT₂ receptors in the present model may not be ruled out. In the short time period examined, however, we consider a direct effect on AT₂ receptors in SMC more likely because of the rapidity of the responses observed. Whether the present observations are vessel specific remains to be determined. Aortic hypertrophy is important in isolated systolic hypertension and left ventricular hypertrophy,³⁵ although arterioles are the major site of increased vascular resistance in hypertension.³⁶

In conclusion, this study in SHR provides the first evidence that AT₂ receptors induce arterial SMC deletion by apoptosis *in vivo*. AT₂ receptors also reduced SMC growth and vascular mass but did not affect blood pressure during AT₁ receptor blockade. In comparison, enalapril-induced apoptosis was not affected by AT₂ receptor blockade, suggesting different mechanism(s) of action for ACE inhibitors and AT₁ antago-

nists. Although the therapeutic significance of these findings remains to be established, we speculate that AT₂-mediated SMC apoptosis may contribute to the potent inhibitory effects of AT₁ antagonists on vascular hypertrophic remodeling in cardiovascular disorders.

Acknowledgments

This work was supported in part by an establishment grant to Denis deBlois as a scholar from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec, a grant from the Medical Research Council of Canada (MRCC; MT-10803), and by Novartis Canada. Bun-Seng Tea holds a studentship from MRCC. We gratefully acknowledge the assistance of Gang He in the RT-PCR studies.

References

1. Timmermans PBMW, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JAM, Smith RD. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev*. 1993; 45:205–251.
2. Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension*. 1999;33:613–621.
3. Pollman MJ, Yamada T, Horiuchi M, Gibbons GH. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis: countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res*. 1996;79:748–756.
4. Yamada T, Akishita M, Pollman MJ, Gibbons GH, Dzau VJ, Horiuchi M. Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis and antagonizes angiotensin II type 1 receptor action: an in vitro gene transfer study. *Life Sci*. 1998;63:PL289–PL295.
5. Sabri A, Levy BI, Poitevin P, Caputo L, Faggin E, Marotte F, Rappaport L, Samuel JL. Differential roles of AT₁ and AT₂ receptor subtypes in vascular trophic and phenotypic changes in response to stimulation with angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:257–264.
6. Levy BI, Benessiano J, Henrion D, Caputo L, Heymes C, Duriez M, Poitevin P, Samuel JL. Chronic blockade of AT₂-subtype receptors prevents the effect of angiotensin II on the rat vascular structure. *J Clin Invest*. 1996;98:418–425.
7. Otsuka S, Sugano M, Makino N, Sawada S, Hata T, Niho Y. Interaction of mRNAs for angiotensin II type 1 and type 2 receptors to vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1998;32: 467–472.
8. Li JS, Touyz RM, Schiffrin EL. Effects of AT₁ and AT₂ angiotensin receptor antagonists in angiotensin II-infused rats. *Hypertension*. 1998; 31:487–492.
9. Walter SV, Hamet P. Enhanced DNA synthesis in heart and kidney of newborn spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1986;8:520–525.
10. Owens GK. Control of hypertrophic versus hyperplastic growth of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 1989;257(6 pt 2):H1755–H1765.
11. Hadrava V, Kruppa U, Russo RC, Lacourciere Y, Tremblay J, Hamet P. Vascular smooth muscle cell proliferation and its therapeutic modulation in hypertension. *Am Heart J*. 1991;122:1198–1203.
12. Hamet P, Richard L, Dam T-V, Teiger E, Orlov SN, Gaboury L, Gossard F, Tremblay J. Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension*. 1995;26:642–648.
13. deBlois D, Tea B-S, Dam T-V, Tremblay J, Hamet P. Smooth muscle cell apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997;29:340–349.
14. Campbell DJ, Kladis A, Valentijn AJ. Effects of losartan on angiotensin and bradykinin peptides and angiotensin-converting enzyme. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995;26:233–240.
15. Touyz RM, Endemann D, He G, Li JS, Schiffrin EL. Role of AT₂ receptors in angiotensin II-stimulated contraction of small mesenteric arteries in young SHR. *Hypertension*. 1999;33:366–372.
16. Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ. The angiotensin II type 2 (AT₂) receptor antagonizes the growth effects of the AT₁ receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92: 10663–10667.
17. Matsubara H. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ Res*. 1998;83:1182–1191.
18. Viswanathan M, Tsutsumi K, Correa FMA, Saavedra JM. Changes in expression of angiotensin receptor subtypes in the rat aorta during development. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;179:1361–1367.
19. Keiser JA, Major TC, Lu GH, Davis LS, Panek RL. Is there a functional cardiovascular role for AT₂ receptors? *Drug Dev Res*. 1993;29:94–99.
20. Farhy RD, Carretero OA, Ho K-L, Scicli AG. Role of kinins and nitric oxide in the effects of angiotensin converting enzyme inhibitors on neointima formation. *Circ Res*. 1993;72:1202–1210.
21. Linz W, Scholkens BA. A specific B₂-bradykinin receptor antagonist HOE 140 abolishes the antihypertrophic effect of ramipril. *Br J Pharmacol*. 1992;105:771–772.
22. Liu YH, Yang XP, Sharov VG, Nass O, Sabbah HN, Peterson E, Carretero OA. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists in rats with heart failure: role of kinins and angiotensin II type 2 receptors. *J Clin Invest*. 1997;99: 1926–1935.
23. Berthiaume N, Hess F, Chen A, Regoli D, D'Orleans-Juste P. Pharmacology of kinins in the arterial and venous mesenteric bed of normal and B₂ knockout transgenic mice. *Eur J Pharmacol*. 1997;333:55–61.
24. Fukuo K, Hata S, Suhara T, Shinto Y, Tsujimoto S, Morimoto S, Ogihara T. Nitric oxide induces upregulation of Fas and apoptosis in vascular smooth muscle. *Hypertension*. 1996;27:823–826.
25. Marcic B, Deddish PA, Jackman HL, Erdos EG. Enhancement of bradykinin and resensitization of its B₂ receptor. *Hypertension*. 1999;33: 835–843.
26. Minshall RD, Erdos EG, Vogel SM. Angiotensin I-converting enzyme inhibitors potentiate bradykinin's inotropic effects independently of blocking its inactivation. *Am J Cardiol*. 1997;80:132A–136A.
27. Boulanger CM. Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31:39–49.
28. Bayer IM, Adamson SL, Langille BL. Atrophic remodeling of the artery-cuffed artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1499–1505.
29. Van Kleef EM, Fingerle J, Daemen MJ. Angiotensin II-induced progression of neointimal thickening in the balloon-injured rat carotid artery is AT₁ receptor mediated. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16: 857–863.
30. deBlois D, Viswanathan M, Su JE, Clowes AW, Saavedra JM, Schwartz SM. Smooth muscle DNA replication in response to angiotensin II is regulated differently in the neointima and media at different times after balloon injury in the rat carotid artery: role of AT₁ receptor expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:1130–1137.
31. Diep QN, Li JS, Schiffrin EL. In vivo study of AT₁ and AT₂ angiotensin receptors in apoptosis in rat blood vessels. *Hypertension*. 1999;34: 617–624.
32. Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT₂-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest*. 1995;95:651–657.
33. Luscher TF. The endothelium in hypertension: bystander, target or mediator? *J Hypertens*. 1994;12:S105–S116.
34. Nora EH, Munzenmaier DH, Hansen-Smith FM, Lombard JH, Greene AS. Localization of the ANG II type 2 receptor in the microcirculation of skeletal muscle. *Am J Physiol*. 1998;275:H1395–H1403.
35. Safar ME, Laurent S. Behaviour of conduit arteries in hypertension. *Clin Exp Hypertens*. 1993;15:1033–1045.
36. Folkow B. "Structural factor" in primary and secondary hypertension. *Hypertension*. 1990;16:89–101.

Reversal of interstitial fibroblast hyperplasia via apoptosis in hypertensive rat heart with valsartan or enalapril

Shant Der Sarkissian^a, Eve-Lyne Marchand^a, David Duguay^a, Pavel Hamet^b,
Denis deBlois^{a,*}

^aDepartment of Pharmacology, University of Montreal, University of Montreal Hospital (CHUM) Research Center, 3840 St.-Urbain Street, Room 7-132B, Montreal, Quebec H2W 1T8, Canada

^bDepartment of Medicine, University of Montreal, University of Montreal Hospital (CHUM) Research Center, 3850 St.-Urbain Street, Montreal, Quebec H2W 1T7, Canada

Received 26 June 2002; accepted 14 November 2002

Abstract

Objective: Renin–angiotensin system inhibitors transiently induce apoptosis at the onset of cardiac hypertrophy regression in spontaneously hypertensive rats (SHRs). The focus of this study is to evaluate the cell selectivity of this response. **Methods:** SHRs were treated with valsartan or enalapril ($30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$) or placebo for 1 to 4 weeks. Stereological and morphological data were obtained from immunohistological analyses. Apoptosis was quantified by DEVDase (caspase-3-like) activity assay and immunoblot analysis of apoptosis-regulatory proteins (Bax and Bcl-2). Identification of the apoptotic cell type was conducted using in situ TUNEL labeling, in conjunction with α -sarcomeric actin or lectin immunoreactivity as markers for cardiomyocytes and endothelial cells, respectively. **Results:** Stereological analysis of the left ventricle revealed significant non-cardiomyocyte hyperplasia in placebo-treated SHRs ($239 \pm 29 \times 10^6$ nuclei) as compared to untreated age-matched normotensive Wistar–Kyoto (WKY) rats ($107 \pm 12 \times 10^6$). In contrast, the number of cardiomyocyte nuclei was comparable between untreated SHRs ($48 \pm 4 \times 10^6$) and WKY rats. After 4 weeks of valsartan or enalapril treatment, SHRs showed significant reductions in systolic blood pressure ($>28\%$), left ventricular hypertrophy ($>9\%$) and cardiomyocyte cross-sectional area ($>17\%$). Moreover, these treatments abolished non-cardiomyocyte hyperplasia in SHR left ventricle without affecting cardiomyocyte number, capillary density or number of capillary per cardiomyocyte nucleus. As a mechanism of cell deletion consistent with apoptosis induction, ventricles showed increased caspase-3 activation (>4.5 -fold) as well as Bax to Bcl-2 protein ratio (>3.2 -fold) within 2 weeks of valsartan or enalapril treatment. Immunohistological analysis revealed a significant increase in TUNEL-positive, lectin-negative non-cardiomyocytes, suggesting a rise in apoptotic interstitial fibroblasts in the left ventricle within 2 weeks of treatment with valsartan or enalapril ($>63\%$), with a return to baseline ($0.033 \pm 0.003\%$) at 4 weeks. Treatments did not affect right ventricular mass, apoptosis or cellularity. **Conclusion:** Cardiac apoptosis induction during regression of left ventricular hypertrophy reverses interstitial fibroblast hyperplasia in SHRs treated with inhibitors of the renin–angiotensin system.

© 2003 European Society of Cardiology. Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: ACE inhibitors; Antihypertensive/diuretic agents; Apoptosis; Hypertension; Hypertrophy

1. Introduction

In recent years, apoptosis, a gene-regulated process of cell self-destruction associated with caspase activation and internucleosomal DNA fragmentation, has emerged as an

important mechanism contributing to cardiac remodeling [1,2]. Several studies have associated enhanced levels of apoptosis with the pathogenesis of cardiac disease, e.g., in the loss of cardiomyocytes and neurons leading to heart failure and cardiac conduction system disorders [3–5]. However, the role of apoptosis in cardiac remodeling is context-dependent and may participate in normal cardiac

*Corresponding author. Tel.: +1-514-890-8000x12919; fax: +1-514-412-7152.

E-mail address: [REDACTED]

Time for primary review 27 days.

remodeling as illustrated by the differential regulation of cardiomyocyte apoptosis between the right and left ventricles during the post-natal period [6].

The spontaneously hypertensive rat (SHR) is a model of primary hypertension in which an imbalance between cell growth and apoptosis favors increased cardiac mass and DNA content in neonates and adults [7–9]. Adult SHRs show cardiac fibroblast hyperplasia [10], a common feature of pathological cardiac remodeling leading to increased extracellular matrix deposition and cardiac fibrosis [11,12]. With aging, the hypertensive heart also shows increased cardiomyocyte apoptosis [4,13,14], a feature that is attenuated following angiotensin converting enzyme inhibition or angiotensin II type 1 (AT_1) receptor blockade [4,10,14,15]. Liu et al. [10] reported an age-dependent increase in cardiac apoptosis in young SHRs, mainly in cardiomyocytes, concomitant with the development of fibroblast hyperplasia. Prophylactic treatment of hypertension with the angiotensin converting enzyme inhibitor ramipril reduces cardiac apoptosis in the long term and prevents the development of fibroblast hyperplasia [10]. Likewise, initiating hydralazine treatment during the pre-hypertensive phase can prevent the development of cardiac hyperplasia in SHRs (deBlois et al., unpublished data). In contrast, hydralazine does not reverse cardiac hyperplasia in adult SHRs [16]. A key question is whether established fibroblast hyperplasia can be reversed in the hypertensive adult. We previously reported that a transient increase in apoptosis occurs at the onset of cardiac hypertrophy regression in SHRs [16]. In this model, internucleosomal fragmentation of ventricular DNA peaks at 1 week of treatment with an AT_1 receptor antagonist, or at 2 weeks of treatment with an equipotent antihypertensive dose of an angiotensin converting enzyme inhibitor. Current evidence suggests that angiotensin II regulation of apoptosis in the heart is cell type-specific. In vitro, angiotensin II increases cardiomyocyte apoptosis, an effect dependent on AT_1 receptor activation [17,18]. In contrast, cultured cardiac fibroblasts undergo AT_1 receptor-dependent proliferation in response to angiotensin II [19].

We therefore postulated that the early phase of cardiac hypertrophy regression induced by inhibitors of the renin–angiotensin system in adult SHR involved the selective deletion of fibroblasts via apoptosis. The present study provides evidence for a beneficial role of selective apoptosis up-regulation in cardiac remodeling induced by anti-hypertensive treatments, namely the reversal of fibroblast hyperplasia.

2. Methods

2.1. Animal procedures

Forty-two male SHRs and six male Wistar–Kyoto (WKY) rats (10 weeks old; weighing ~250 g) were

purchased from Charles-River (St.-Constant, Canada) and housed for at least 1 week before treatment. Food and water were administered ad libitum. SHRs ($n=6$ /group) were randomly assigned to treatment with the selective AT_1 antagonist valsartan ($30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ p.o.; gift of Novartis, Toronto, Canada) or the angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril ($30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ p.o.; Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) in the drinking water for 1, 2 or 4 weeks. Control SHRs and WKY rats received vehicle. Systolic blood pressure was determined by the tail-cuff method at 12 and 26 days of treatment ($n=6$ /group) and tissues were isolated after 1 and 2 weeks as we described previously [16]. Briefly, rats were anesthetized with a single i.m. injection of ketamine (80 mg kg^{-1} ; Ayerst, Guelph, Canada), xylazine (4 mg kg^{-1} ; Bayer, Etobicoke, Canada), and acepromazine (2 mg kg^{-1} ; Ayerst, Montreal, Canada), and killed by exsanguination via the jugular vein. Both ventricles were isolated together, weighed and an equatorial cross-section (3 mm) was fixed in paraformaldehyde (4%). In SHRs killed after 4 weeks of treatment and age-matched WKY ($n=6$ /group) anesthesia was followed by an i.v. injection of 1.5 ml KCl (100 mmol l^{-1}) via the vena cava to induce diastolic cardiac arrest. Ventricles were isolated together, weighed and fixed overnight in 4% paraformaldehyde. Equatorial cross-sections of ventricles were paraffin-embedded. All animal manipulations were conducted in accordance with the *Care and Use of Laboratory Animals* guidelines published by the National Institutes of Health (NIH).

2.2. Hypertrophy and hyperplasia measurements

We used the NIH Image 1.61 program (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>) to measure the cross-sectional area of the ventricles, ventricular chambers and cardiomyocytes at 4 weeks. Three sets of randomly chosen pictures (from the left and right ventricular sub-epicardium, sub-endocardium and mid-myocardium) were captured from hematoxylin stained histological sections and digitally enhanced. The total number of cardiomyocytes within each ventricle was assessed stereologically as per Anversa et al. [20]. A similar procedure was used to calculate total non-cardiomyocyte number with the exception that the area covered by the (unstained) cell body of non-cardiomyocytes was estimated using the average nuclear length measurements ($10.5 \pm 0.3 \text{ } \mu\text{m}$ in controls; no change with treatment), extended half a time in the x and y axes around each nucleus.

2.3. DEVDase activity

Ventricles were pulverized in liquid nitrogen and an aliquot (5 mg) was lysed to measure DEVDase activity using the fluorogenic substrate DEVD-AMC ($40 \text{ } \mu\text{M}$) in the presence or absence of the Ac-DEVD-CHO ($1 \text{ } \mu\text{M}$), a caspase-3 inhibitor as previously described [21]. Caspase-

3-like activity was defined as the Ac-DEVD-CHO-sensitive activity.

2.4. Expression of apoptosis-regulatory proteins

The protein levels of active caspase-3 17–20 kDa fragments, Bcl-2 and Bax in cardiac tissue were examined by Western Blot analysis. Total heart was pulverized in liquid nitrogen and a 50 mg aliquot was lysed in extraction buffer [10 mmol l⁻¹ Tris-HCl, pH 7.5, 1% Triton X-100, 4 mmol l⁻¹ β -glycerophosphate, 4 mmol l⁻¹ sodium fluoride, 1 mmol l⁻¹ EDTA, 1 mmol l⁻¹ EGTA, 200 μ mol l⁻¹ sodium orthophosphate, 51 μ mol l⁻¹ benzamide, 0.5 mmol l⁻¹ phenylmethylsulfonylfluoride, 21 μ mol l⁻¹ leupeptin, 5 mmol l⁻¹ dithiothreitol (DTT) and 1 μ mol l⁻¹ microcystin (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada)]. Western Blot was carried out with equal amounts of proteins (25 μ g) loaded onto a 15% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel and transferred to Hybond-C extra membrane (Amersham Bioscience, London, UK). Membranes were hybridized with anti-caspase-3 (1:1000; BD Pharmingen, Mississauga, Canada), anti-Bax or anti-Bcl-2 (1:1000; Santa-Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA) antibodies followed by incubation with goat anti-rabbit (caspase-3) or goat anti-mouse (Bax, Bcl-2) horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:2000; Santa-Cruz Biotech) according to manufacturer's protocol. Membranes were then incubated with ECL Plus (Life Science Products, Boston, MA, USA), exposed to film and developed. The image was digitized and band intensity was quantified using NIH Image 1.61 program. For caspase-3, the 32 kDa (procaspase-3) and 17–20 kDa (indicative of enzyme activation) fragments were measured.

2.5. Immunohistochemistry

Quantification of apoptotic nuclei was conducted in deparaffinized ventricular cross-sections (5 μ m) using a three-step in situ fluorescent labeling protocol as per Cigola et al. [17] with minor modifications. As a first step, in situ terminal deoxynucleotidyl transferase (tdt)-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) of nuclei was used as a marker of apoptosis. Modifications from the published protocol [17] included pre-incubation at room temperature for 15 min in a 0.1% saponin-EGTA solution, amount of tdt enzyme (20 units; Roche, Indianapolis, IN, USA), biotin-16-dUTP (0.5 nmol l⁻¹; Roche) and FITC-labeled extravidin (0.06 μ g ml⁻¹; Sigma Chemicals). Negative controls had water instead of tdt. As a second step, immunoreactivity for α -sarcomeric actin was used as a marker for cardiomyocytes. A primary mouse IgG antibody directed against α -sarcomeric actin (1:40; 5C5 clone, Sigma Chemicals) and a TRITC-labeled goat IgG secondary antibody directed against mouse IgG (1:100; Sigma Chemicals) were used. As a third step, 5 nmol l⁻¹

propidium iodide (ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA) was used for total cardiac nuclei staining. In a duplicate set of sections, endothelial cells were labeled using 5 μ g ml⁻¹ TRITC-labeled lectin (*Bandeiraea simplicifolia*; Sigma Chemicals) and TUNEL positive nuclei were labeled using 0.1 μ g ml⁻¹ AMCA-labeled streptavidin (Vector Laboratories). Appropriate filters were used to quantify labeled cells by fluorescence microscopy separately in right and left ventricles. All TUNEL-positive nuclei (cardiomyocyte, non-cardiomyocyte: endothelial and fibroblast) in each section were counted. The epicardium was analyzed separately. Total number of cell specific nuclei per cross-section was estimated by counting profiles in 3 randomly chosen fields from both ventricles (250 \times ; 0.02 mm²/field) and multiplying the average numerical density by the ventricular cross-sectional area. An average of 500 endothelial cell profiles were counted for each rat and results were expressed as number of capillaries/mm². In the epicardium, all nuclei were counted. A separate set of sections were stained with Sirius red to evaluate the percentage of ventricular area occupied by collagen [22].

2.6. Statistical analysis

Results were analyzed using analysis of variance and unpaired Student's *t*-test with Bonferroni correction for multiple comparisons where appropriate. TUNEL assay was analyzed with the nonparametric Mann-Whitney test. Values are presented as mean \pm S.E.M. *P* < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

Systolic blood pressure (mmHg) was significantly decreased by therapy after 12 days (controls: 206 \pm 9; valsartan: 166 \pm 10; enalapril: 155 \pm 9) and 26 days (controls: 212 \pm 10; valsartan: 152 \pm 8; enalapril: 148 \pm 9). Body weight was not significantly affected after 4 weeks of treatment with valsartan (285 \pm 12 g) or enalapril (277 \pm 11 g), compared with controls (295 \pm 14 g), whereas left ventricular weight to body weight ratio was significantly reduced with valsartan (>9%) and enalapril (>17%).

Morphological data obtained on equatorial sections of diastole-arrested hearts are shown in Table 1. As compared to WKY rats, untreated SHR rats showed increased left ventricular cross-sectional area and cardiomyocyte cross-sectional area. SHR rats tended to have a (non-significant) larger chamber cross-sectional area in left ventricle as compared to WKY rats. Unexpectedly, the only difference in relative collagen content was in the right ventricle of WKY rats where there was a slight increase over SHR rats. After 4 weeks, valsartan tended to reduce and enalapril completely normalized left ventricular cross-sectional area without affecting ventricular chamber size or right ventricular parameters. Valsartan and enalapril significantly

Table 1

Ventricular morphology of SHR treated with valsartan or enalapril for 4 weeks or age-matched untreated WKY rats

	WKY	SHR control	SHR valsartan	SHR enalapril
Left ventricle				
Tissue cross-sectional area (mm ²)	47±3*	60±1	54±1*	47±1*
Chamber cross-sectional area (mm ²)	15±2	21±1	20±1	21±1
Relative collagen content (%)	15.5±0.4	15.2±0.5	16.1±0.2	14.4±0.4
Cardiomyocyte cross-sectional area (μm ²)	182±13*	240±11	177±4*	169±6*
Right ventricle				
Tissue cross-sectional area (mm ²)	9.3±1.3	7.5±0.5	7.1±0.2	7.8±0.7
Chamber cross-sectional area (mm ²)	5.7±0.6	5.4±0.4	6.4±0.5	5.8±0.4
Relative collagen content (%)	15.9±0.3*	14.4±0.2	14.1±0.3	14.0±0.5

Equatorial sections of diastole-arrested, paraformaldehyde-fixed hearts were studied.

* Significantly different ($P<0.05$) from SHR control group ($n=6$ /group).

decreased cross-sectional area of left ventricular cardiomyocytes down to levels observed in WKY rats. The relative collagen content in either ventricle of SHRs was maintained after valsartan or enalapril for 4 weeks. Ultimately, both valsartan and enalapril significantly decreased the total number of non-cardiomyocytes in the left ventricle by 37% ($P=0.002$). Levels reached that of age-matched normotensive WKY rats ($107\pm12\times10^6$) without affecting the total number of cardiomyocyte nuclei at 4 weeks (Fig. 1A). Thus, the ratio of cardiomyocyte to non-cardiomyocyte nuclei, which was low in controls (0.17 ± 0.01), was normalized with valsartan (0.24 ± 0.01 ;

$P<0.01$) and enalapril (0.25 ± 0.02 ; $P<0.01$) and increased to values similar to those of the WKY rats (0.22 ± 0.02 ; $P<0.05$ versus control SHRs). In contrast, the right ventricle showed no significant change in cellularity with therapy (Fig. 1B). At 4 weeks, capillary density (capillary/mm²) and capillaries per myocyte in the left ventricular myocardium remained unchanged by treatments (versus respective controls: 1405 ± 39 and 1.01 ± 0.05 , Fig. 1C, D). The absolute number of epicardial cells per cross-section at 4 weeks was reduced, though the change was not significant (valsartan: 559 ± 85 ; enalapril: 676 ± 58 ; controls: 756 ± 91 ; NS).

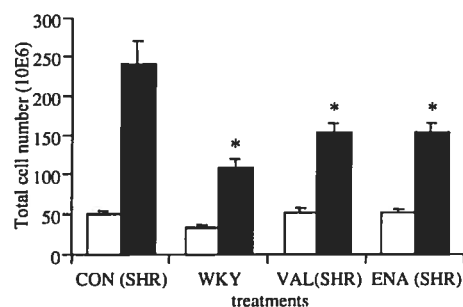
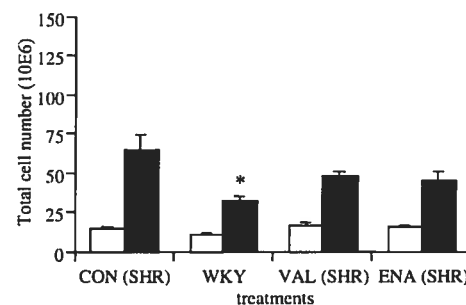
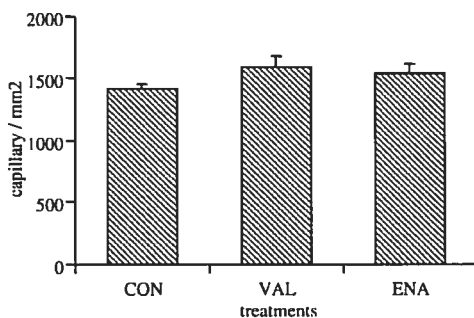
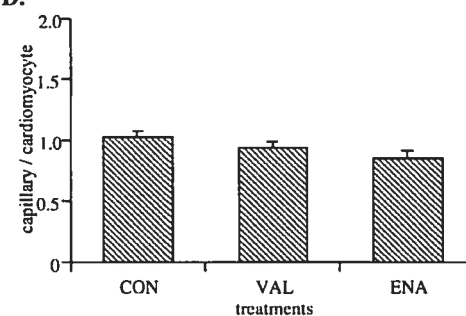
A. Left ventricle**B. Right ventricle****C.****D.**

Fig. 1. Changes in the total number of cardiomyocyte nuclei (□) and non-cardiomyocyte nuclei (■) in the (A) left ventricle and (B) right ventricle of SHR treated for 4 weeks with valsartan or enalapril or age-matched untreated WKY rats. Changes in the total number of (C) capillaries per cross-section (capillary density), (D) capillary per myocyte, in the left ventricle of SHR treated for 4 weeks with valsartan or enalapril. * Significantly different ($P<0.003$) from SHR control group.

Our previous time course studies showed that DNA fragmentation indicative of apoptosis is maximally increased in the SHR heart after 1 week of AT₁ antagonist treatment and 2 weeks of angiotensin converting enzyme inhibitor treatment during regression of hypertrophy [16]. Thus, these time points for valsartan (1 week) and enalapril (2 weeks) were selected for apoptosis study and in situ determination of cell type undergoing apoptosis in the ventricles.

Consistent with these previous observations, ventricular DEVDase (caspase-3-like) activity was increased by more than 4.5-fold after 1 week of valsartan or 2 weeks of enalapril treatment (Fig. 2A). These results were corroborated with immunoblot analyses showing transient 3.6- and 4.2-fold increases in caspase-3 cleavage fragments (bands at 17–20 kDa) with valsartan and enalapril, respectively, without alteration in pro-caspase-3 (32 kDa) expression levels (not shown). In addition, measurement of cardiac pro- (Bax) and anti-apoptotic (Bcl-2) protein levels showed significant 3.4- and 3.2-fold increases in the Bax to Bcl-2 ratio with valsartan and enalapril, respectively (Fig. 2B).

Fig. 3A shows a representative photomicrograph of an area within the myocardium in which all (propidium iodide-positive) nuclei appear in bright red, well delineated spots, whereas nuclei within the α -sarcomeric actin-positive area (diffuse red area) were identified as cardiomyocyte nuclei. In Fig. 3B, the same field examined under a green filter to detect FITC-labeling shows a TUNEL-positive non-cardiomyocyte nucleus. For each animal, a subset of sections was stained for identification of endothelial cells using lectin as a marker (bright red spots in Fig. 3C). In Fig. 3D, the same field examined under a blue filter to detect AMCA-labeling shows a TUNEL-positive, lectin-negative nucleus, considered as an apoptotic fibroblast. Treatment with valsartan for 1 week or enalapril for 2 weeks each caused a significant twofold increase in TUNEL-positive fibroblasts (Fig. 4A) selectively in the interstitium of the left ventricle. In contrast, TUNEL-positive endothelial nuclei remained unchanged versus controls (Fig. 4B). TUNEL-positive fibroblasts returned to basal values ($0.026 \pm 0.005\%$) after 4 weeks of valsartan ($0.033 \pm 0.003\%$) or enalapril ($0.034 \pm 0.004\%$) treatment. TUNEL-positive cardiomyocyte nuclei were increased with enalapril at 2 weeks (by 75% in the left ventricle only) (Fig. 4C). Valsartan-treated hearts at 1 week showed a similar though non-significant tendency. After 4 weeks, TUNEL-positive cardiomyocyte nuclei were not significantly different between rats treated with placebo ($0.008 \pm 0.002\%$), valsartan ($0.006 \pm 0.001\%$) or enalapril ($0.006 \pm 0.001\%$). As shown in Fig. 3E, epicardial cells showed by far the greatest frequency of TUNEL-positive nuclei. TUNEL-positive epicardial cells were increased with valsartan at 1 week (45 ± 2 vs. $38 \pm 2\%$ in age-matched controls; $P < 0.05$) and enalapril at 2 weeks (46 ± 1 vs. $32 \pm 2\%$ in age-matched controls; $P < 0.05$), with

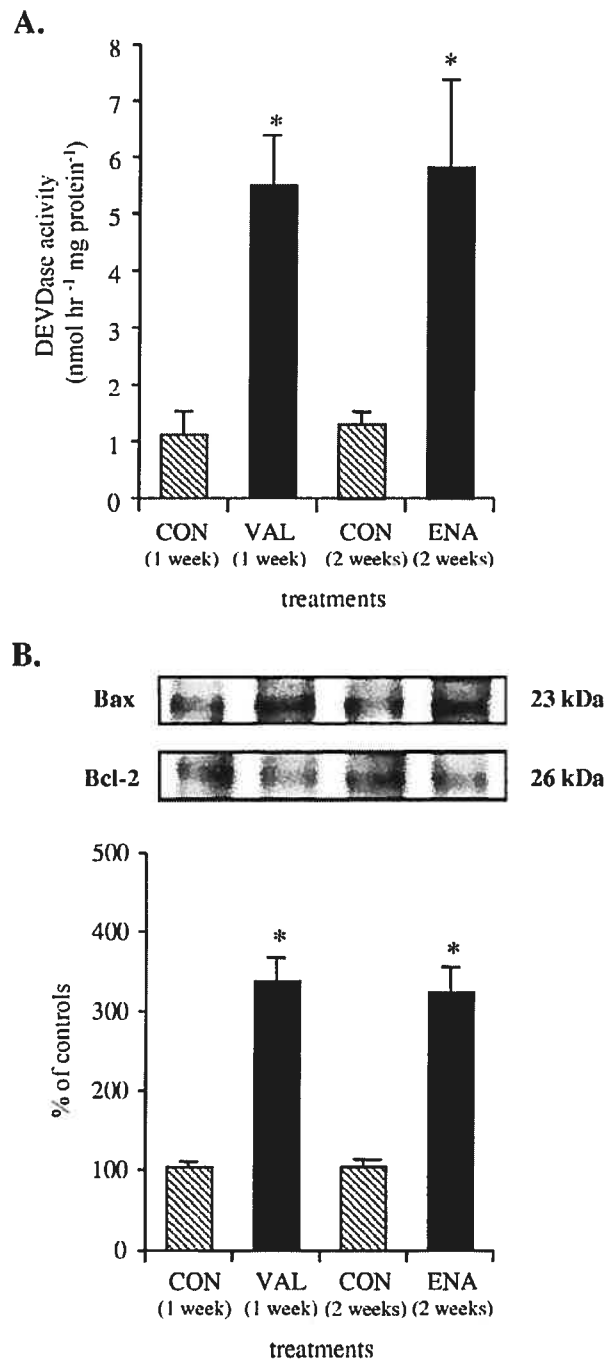


Fig. 2. (A) Increased DEVDase activity in homogenates of SHR ventricles isolated at 1 week of valsartan treatment or 2 weeks of enalapril treatment (■) as compared to respective controls (▨). * Significantly different ($P < 0.001$) from control group ($n = 6$ /group). (B) Changes of apoptosis regulatory protein expression immunoblotted and probed with anti-Bax or anti-Bcl-2 antibody. Inset shows representative band corresponding to the molecular mass of Bax (23 kDa) and Bcl-2 (26 kDa). The graph represents the Bax/Bcl-2 protein expression plotted for tissue lysates obtained from SHRs treated for 1 week with valsartan and 2 weeks with enalapril (■). Data are presented as percentage of respective controls (▨). * Significantly different ($P < 0.05$) from control group ($n = 6$ /group).

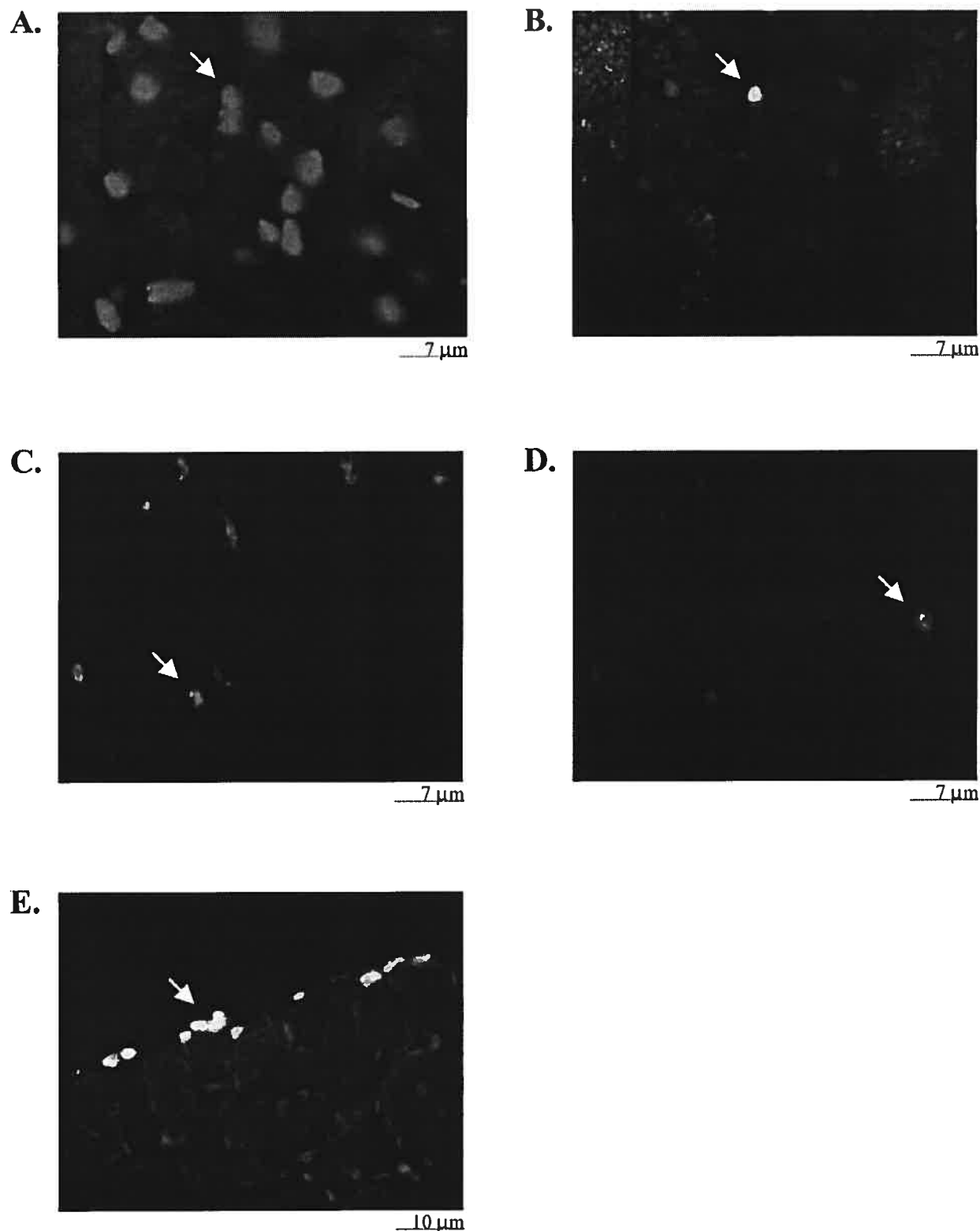


Fig. 3. Photomicrographs showing (A) areas immunoreactive for α -sarcomeric actin (cardiomyocyte cell body in diffuse red) and areas positive for the total nuclear stain propidium iodide (bright red, sharply delineated spots). The arrow points a non-cardiomyocyte nucleus (located outside the α -sarcomeric actin stained area) ($\times 600$). (B) The same field visualized under an FITC filter showing the same nucleus as a TUNEL-positive (bright green, sharply delineated) nucleus ($\times 600$). (C) Endothelial cells (bright red, sharply delineated spots) after staining with TRITC-labeled lectin ($\times 600$). (D) In the same field, visualized under a DAPI filter, the arrow points a TUNEL-positive (bright blue, sharply delineated), lectin-negative non-cardiomyocyte nuclei, indicating an interstitial fibroblast ($\times 600$). (E) TUNEL-positive nuclei prevalent in the epicardium ($\times 400$).

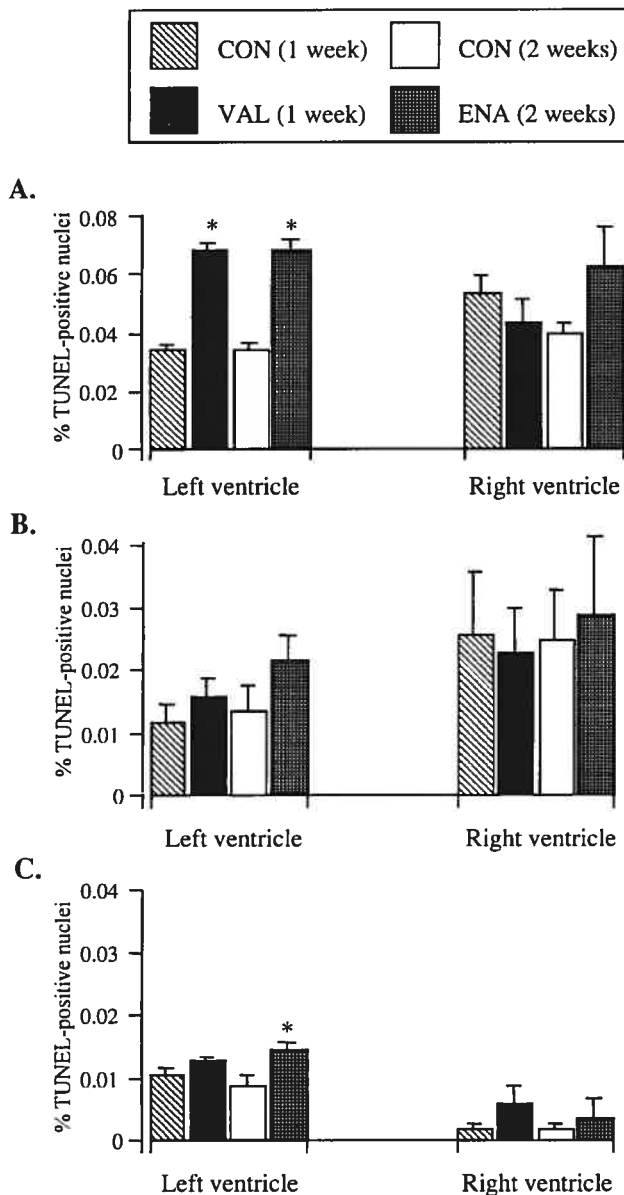


Fig. 4. Effects of treatment with valsartan for 1 week and enalapril for 2 weeks on the percentage of TUNEL-positive staining versus respective controls in (A) fibroblasts, (B) endothelial cells, (C) cardiomyocytes of SHR per cross-section of left and right ventricles. Data were analyzed using the nonparametric Mann–Whitney test. * Significantly different ($P < 0.05$) from control group ($n = 6/\text{group}$).

a return to basal levels at 4 weeks for both treatments (valsartan: $37 \pm 3\%$; enalapril: $35 \pm 3\%$; age-matched controls: $38 \pm 1\%$; NS). Both ventricles showed similar frequencies of TUNEL-positive epicardial cells (not shown).

4. Discussion

The present results indicate significant cell deletion by apoptosis during onset of cardiac hypertrophy regression

was restricted to interstitial fibroblasts in the left ventricle of SHRs treated with valsartan or enalapril. As a result, fibroblast hyperplasia in the adult SHR was normalized within 4 weeks of treatment, down to levels seen in WKY rats. Apoptosis increase was transient even though anti-hypertensive treatments were maintained, consistent with our previous observations [16]. Both drugs had a tendency to transiently increase TUNEL staining also in cardiomyocytes (significant with enalapril). The cumulative effect was marginal, however, since the total number of cardiomyocyte nuclei was not significantly decreased after 4 weeks of treatment in the left ventricle. Administration of quinapril decreases the percentage of tetraploid cardiomyocytes in SHRs [23], an effect that reflects either nuclear division or polyploid cell deletion. Cardiomyocyte polyploid nuclei may be removed by apoptosis during treatment with renin–angiotensin system inhibitors. Alternatively, TUNEL staining may label nuclei undergoing DNA repair [24]. After the 4-week treatments, the number of cardiomyocytes in the right and left ventricles of SHRs remained unchanged and higher than in WKY rats, possibly reflecting compensated cardiac hypertrophy in SHR at that age. In humans, right septal endomyocardial biopsies from hypertensive patients show greater caspase-3 immunoreactivity, Bax to Bcl-2 protein ratio and TUNEL staining in both cardiomyocytes and interstitial fibroblasts as compared to tissues from normotensive volunteers [25]. These high levels of apoptosis in cardiomyocytes and interstitial fibroblasts are attenuated significantly, though not normalized, following administration of losartan for 12 months. The discrepancy with the present results may reflect species specificities, different stages of the disease or time-dependent regulation of cardiac apoptosis during treatment.

The beneficial effects of angiotensin pathway inhibitors include the amelioration of oxygen diffusion in the left ventricular myocardium. Previous reports show that cardiac capillaries are not decreased in SHRs receiving renin–angiotensin system inhibitors [26,27]. Consistent with this, the treatments in this study did not increase TUNEL-positive endothelial cells or decrease capillary number or density at 4 weeks. In the non-cardiomyocyte population of the heart, fibroblasts, representing the main cell type, play a key role in cardiac connective tissue regulation [28]. At the age examined, the left ventricles of SHRs did not show evidence of collagen accumulation as compared to WKY rats possibly due to the relatively recent onset of hypertension in SHRs. A significant increase in left ventricular collagen content in SHR versus WKY has been reported in some but not all studies [29,30]. Consistent with a lack of enhanced collagen deposition in untreated SHRs left ventricles, these tissues showed no reduction in relative collagen tissue content after 4 weeks of treatment. Since left ventricular mass was reduced, these data suggest a proportional degradation of myocardial fibrillar collagen within the 4-week treatments. Varo et al. [31] recently

reported that AT₁ receptor blockade for 14 weeks stimulates collagenase activity and reduces fibrosis in SHR left ventricles. As an additional mechanism, the present data suggest that a reduction of fibroblast hyperplasia may contribute to decreased myocardial extracellular matrix mass.

The induction of fibroblast apoptosis and the reduction in ventricular cross-sectional area occurred only in the left ventricle, suggesting a possible causal relationship between these two processes. The absence of right ventricular apoptosis also suggests a role for blood pressure reduction. It is important to note, however, that effective antihypertensive treatment with hydralazine does not induce cardiac apoptosis or mass regression, suggesting pressure independent influences [16]. We previously reported that transient apoptosis induction during regression of aortic hypertrophy is dependent on pro-apoptotic AT₂ receptors for angiotensin II in SHRs treated with the AT₁ antagonist valsartan but not enalapril [32]. We recently observed that transient cardiac apoptosis induced by either valsartan or enalapril was not affected by AT₂ receptor blockade (Der Sarkissian et al., unpublished data), suggesting a role for downregulation of AT₁ receptor signaling in the induction of the time window of cardiac apoptosis in this model. The stimulation of AT₁ receptors activates pro-growth and anti-apoptotic signaling pathways in mesenchymal cells such as fibroblasts and smooth muscle cells, including Akt activation, reactive oxygen species generation, and growth factor expression [33,34]. One candidate is insulin-like growth factor 1, which is induced by angiotensin II [35] and which inhibits apoptosis in cardiac fibroblasts via a mechanism up-stream of caspase-3 but independent of Bax or Bcl-2 expression [36]. Cardiac Bax to Bcl-2 ratio was increased during apoptosis in the present study, however, suggesting an alternative pathway. Tissue inhibitor of metalloproteinase-4 (TIMP-4), which shows dysregulated expression during pathological cardiac remodeling [37], was recently shown to induce apoptosis in transformed, although not in normal, cardiac fibroblasts [38]. Pathways involved in regulating fibroblast apoptosis during cardiac remodeling remain to be better defined.

The present results confirm our previous observations that cardiac mass regression is associated with induction of apoptosis in the epicardial region [16]. The epicardium, which is part of the cardiac pleura, is populated by mesothelial cells and is a major expression site for matrix metalloproteinases [39] and several factors modulating cardiomyocyte and non-cardiomyocyte behavior, including angiotensin II [40]. The contribution of mesothelial cells to ventricular hypertrophy regression is not clear but may reflect proportional remodeling of the pleura to accommodate the change in ventricular mass. Interestingly, epicardial apoptosis was similar between the right and left ventricles, thus ruling out a direct causal relationship between these events. Post-operative fibrosis of the cardiac pleura is associated with increased local expression of

angiotensin-converting enzyme [41] and AT₁ receptors [42]. Considering the present findings, it is intriguing to speculate that the suppression of post-operative pericardial fibrosis by AT₁ receptor blockade [43] involves enhanced mesothelial cell death by apoptosis. Also intriguing, are the high basal levels of TUNEL-positive mesothelial cells (30% range), which may suggest a high turnover rate.

Several studies showed that inhibition of the renin-angiotensin system decreases cardiomyocyte apoptosis in hypertension [4,10,14,15]. Considering these findings with the present data, we propose that the beneficial cardiac effects of angiotensin II pathway inhibitors may involve cell type-specific regulation of apoptosis, with an early decrease in fibroblast survival and a long-term increase in cardiomyocyte survival. If confirmed in humans, the ability to reduce fibroblast hyperplasia via apoptosis may have important implications in the treatment of advanced cardiac fibrotic diseases.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Canadian Institute of Health Research (CIHR; MOP-42452). D.D. is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. S.D.S. and E.L.M. both hold an award from the Heart and Stroke Foundation of Canada/CIHR. We would like to acknowledge the help of Dr. Maria Antonia Fortuno and Dr. Martin G. Sirois in developing the immunohistochemistry protocols and of Marie-France Ross in conducting the quantitative image analysis.

References

- [1] Anversa P, Olivetti G, Leri A, Liu Y, Kajstura J. Myocyte cell death and ventricular remodeling. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1997;6:169–176.
- [2] Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res* 1998;82:1111–1129.
- [3] Anversa P. Myocyte death in the pathological heart. *Circ Res* 2000;86:121–124.
- [4] Diez J, Fortuno MA, Ravassa S. Apoptosis in hypertensive heart disease. *Curr Opin Cardiol* 1998;13:317–325.
- [5] James TN. Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. *Annu Rev Physiol* 1998;60:309–325.
- [6] Kajstura J, Mansukhani M, Cheng W et al. Programmed cell death and expression of the protooncogene bcl-2 in myocytes during postnatal maturation of the heart. *Exp Cell Res* 1995;219:110–121.
- [7] Hamet P. Proliferation and apoptosis in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1995;4:1–7.
- [8] Moreau P, Tea BS, Dam TV, Hamet P. Altered balance between cell replication and apoptosis in hearts and kidneys of newborn SHR. *Hypertension* 1997;30:720–724.
- [9] Walter SV, Hamet P. Enhanced DNA synthesis in heart and kidney of newborn spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1986;8:520–525.
- [10] Liu JJ, Peng L, Bradley CJ et al. Increased apoptosis in the heart of genetic hypertension, associated with increased fibroblasts. *Cardiovasc Res* 2000;45:729–735.

- [11] Brilla CG, Matsubara L, Weber KT. Advanced hypertensive heart disease in spontaneously hypertensive rats. Lisinopril-mediated regression of myocardial fibrosis. *Hypertension* 1996;28:269–275.
- [12] Weber KT. Fibrosis and hypertensive heart disease. *Curr Opin Cardiol* 2000;15:264–272.
- [13] Teiger E, Dam TV, Richard L et al. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest* 1996;97:2891–2897.
- [14] Li Z, Bing OH, Long X, Robinson KG, Lakatta EG. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol* 1997;272:H2313–H2319.
- [15] Leri A, Claudio PP, Li Q et al. Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin–angiotensin system and decreases the Bcl-2-to-Bax protein ratio in the cell. *J Clin Invest* 1998;101:1326–1342.
- [16] Tea BS, Dam TV, Moreau P, Hamet P, deBlois D. Apoptosis during regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats: temporal regulation and spatial heterogeneity. *Hypertension* 1999;34:229–235.
- [17] Cigola E, Kajstura J, Li B, Meggs LG, Anversa P. Angiotensin II activates programmed myocyte cell death in vitro. *Exp Cell Res* 1997;231:363–371.
- [18] Ravassa S, Fortuno MA, Gonzalez A et al. Mechanisms of increased susceptibility to angiotensin II-induced apoptosis in ventricular cardiomyocytes of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2000;36:1065–1071.
- [19] Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II—induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res* 1993;73:413–423.
- [20] Anversa P, Zhang X, Li P, Capasso JM. Chronic coronary artery constriction leads to moderate myocyte loss and left ventricular dysfunction and failure in rats. *J Clin Invest* 1992;89:618–629.
- [21] Orlov SN, Thorin-Trescases N, Kotelevtsev SV, Tremblay J, Hamet P. Inversion of the intracellular Na⁺/K⁺ ratio blocks apoptosis in vascular smooth muscle at a site upstream of caspase-3. *J Biol Chem* 1999;274:16545–16552.
- [22] Escolar JD, Tejero C, Escolar MA, Montalvo F, Garisa R. Architecture, elastic fiber, and collagen in the distal air portion of the lung of the 18-month-old rat. *Anat Rec* 1997;248:63–69.
- [23] Panizo-Santos A, Sola JJ, Pardo-Mindan FJ et al. Angiotensin converting enzyme inhibition prevents polyploidization of cardiomyocytes in spontaneously hypertensive rats with left ventricular hypertrophy. *J Pathol* 1995;177:431–437.
- [24] Kanoh M, Takemura G, Misao J et al. Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy: not apoptosis but DNA repair. *Circulation* 1999;99:2757–2764.
- [25] Gonzalez A, Lopez B, Ravassa S et al. Stimulation of cardiac apoptosis in essential hypertension: potential role of angiotensin II. *Hypertension* 2002;39:75–80.
- [26] Zhu YC, Zhu YZ, Gohlke P, Stauss HM, Unger T. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II AT1 receptor antagonism on cardiac parameters in left ventricular hypertrophy. *Am J Cardiol* 1997;80:110A–117A.
- [27] Gohlke P, Linz W, Scholkens B et al. Vascular and cardiac protection by ramipril in spontaneously hypertensive rats: prevention versus regression study [published erratum appears in *Br J Clin Pract Symp Suppl* 1996;50(6):293]. *Br J Clin Pract Suppl* 1996;84:1–10.
- [28] Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* 1999;79:215–262.
- [29] Susic D, Francischetti A, Frohlich ED. Prolonged L-arginine on cardiovascular mass and myocardial hemodynamics and collagen in aged spontaneously hypertensive rats and normal rats. *Hypertension* 1999;33:451–455.
- [30] Yu HC, Burrell LM, Black MJ et al. Salt induces myocardial and renal fibrosis in normotensive and hypertensive rats. *Circulation* 1998;98:2621–2628.
- [31] Varo N, Iraburu MJ, Varela M et al. Chronic AT1 blockade stimulates extracellular collagen type I degradation and reverses myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2000;35:1197–1202.
- [32] Tea BS, Der Sarkissian S, Touyz RM, Hamet P, deBlois D. Proapoptotic and growth-inhibitory role of angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats in vivo. *Hypertension* 2000;35:1069–1073.
- [33] Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. Superoxide induces apoptosis in cardiomyocytes, but proliferation and expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts. *FEBS Lett* 1999;448:206–210.
- [34] Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2175–2183.
- [35] van Eickels M, Vetter H, Grohe C. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition attenuates insulin-like growth factor-I (IGF-I) induced cardiac fibroblast proliferation. *Br J Pharmacol* 2000;131:1592–1596.
- [36] Mockridge JW, Benton EC, Andreeva LV et al. IGF-1 regulates cardiac fibroblast apoptosis induced by osmotic stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273:322–327.
- [37] Mujumdar VS, Tyagi SC. Temporal regulation of extracellular matrix components in transition from compensatory hypertrophy to decompensatory heart failure. *J Hypertens* 1999;17:261–270.
- [38] Tummalapalli CM, Heath BJ, Tyagi SC. Tissue inhibitor of metalloproteinase-4 instigates apoptosis in transformed cardiac fibroblasts. *J Cell Biochem* 2001;80:512–521.
- [39] Marshall BC, Santana A, Xu QP et al. Metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in mesothelial cells. Cellular differentiation influences expression. *J Clin Invest* 1993;91:1792–1799.
- [40] Ou R, Sun Y, Ganjam VK, Weber KT. In situ production of angiotensin II by fibrosed rat pericardium. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28:1319–1327.
- [41] Sun Y, Weber KT. Angiotensin converting enzyme and myofibroblasts during tissue repair in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28:851–858.
- [42] Sun Y, Weber KT. Cells expressing angiotensin II receptors in fibrous tissue of rat heart. *Cardiovasc Res* 1996;31:518–525.
- [43] Loging JA, New RB, Baicu SC et al. Effects of angiotensin type-I receptor blockade on pericardial fibrosis. *J Surg Res* 1999;87:101–107.

Caspase-Dependent Cell Death Mediates the Early Phase of Aortic Hypertrophy Regression in Losartan-Treated Spontaneously Hypertensive Rats

Eve-Lyne Marchand, Shant Der Sarkissian, Pavel Hamet, Denis deBlois

Abstract—Blockade of angiotensin type 1 (AT_1) receptors induces smooth muscle cell (SMC) death and regression of aortic hypertrophy in spontaneously hypertensive rats (SHR). We postulated that SMC death and vascular remodeling in this model may be attenuated by z-Val-Ala-Asp(OMe)-CH₂F (z-VAD-fmk), a tripeptide inhibitor of caspase enzymes mediating apoptosis. To determine the time course of SMC death and aortic remodeling, SHR were treated with losartan (30 mg/kg per day) for up to 9.5 days. Transient SMC apoptosis occurred in the aortic media with a peak around day 5 of treatment, with increases in the Bax to Bcl-2 protein ratio (>3-fold), in active caspase-3 (5.6-fold), in TUNEL-positive nuclei (19-fold), preceding by 24 hours the peak activation of caspase-9 (3.8-fold), and significant reductions in SMC number (46%) and aortic cross-sectional area (8.5%) at 5.5 days. The decrease in total aortic DNA reached significance at 6.5 days (29%). Blood pressure reduction with losartan was progressive and reached significance at day 7 of treatment. Next, we examined the causal link between vascular apoptosis and remodeling. SHR received placebo or losartan (30 mg/kg per day) for 6 days. During the last 24 hours, a subgroup of losartan-treated rats received 3 IV injections of z-VAD-fmk (cumulative dose: 4.4 mg · kg⁻¹). All other rats received the vehicle, DMSO. The 24-hour cotreatment with z-VAD-fmk effectively prevented losartan-induced caspase-3 activation and internucleosomal DNA fragmentation, as well as SMC depletion and the reductions in aortic mass and DNA content. Together, these data suggest that caspase-dependent SMC death mediates the early phase of vascular remodeling in response to AT_1 receptor blockade in this model of hypertension. (*Circ Res.* 2003;92:777-784.)

Key Words: caspase ■ apoptosis ■ aorta ■ hypertrophy ■ hypertension

In recent years, programmed cell death has emerged as an important mechanism of cardiovascular remodeling. Apoptosis is a form of programmed cell death associated with the activation of caspases,¹ notably caspase-3, which acts as a downstream key executioner of the death program,² and internucleosomal fragmentation of DNA.³ The prototypical irreversible inhibitor of caspases z-Val-Ala-Asp(OMe)-CH₂F (z-VAD-fmk) is a cell-permeable tripeptide with broad specificity for all known caspases.² Z-VAD-fmk potently inhibits apoptosis in vitro as well as in vivo in cardiomyocytes, neurons, and hepatocytes.^{4–6}

The spontaneously hypertensive rat (SHR) is a genetic model of primary hypertension showing dysregulations of cell proliferation and death contributing to increased vascular mass and DNA content.⁷ We first reported that smooth muscle cell (SMC) death is enhanced transiently during the regression of aortic hypertrophy in SHR treated with antihypertensive agents, an effect that is not secondary to blood pressure reduction.^{8,9} Within 1 week of treatment with an

antagonist of type 1 (AT_1) receptors for angiotensin II, SHR aortic DNA fragmentation is maximally increased.^{8,9}

The present study explored the causal relationship between SMC apoptosis and vascular remodeling induced by AT_1 antagonist treatment. We first determined the relative time course of blood pressure reduction, SMC apoptosis, and aortic mass regression in SHR treated with losartan. Second, z-VAD-fmk was administered in vivo in an attempt to block losartan-induced cell death and vascular mass regression. The results suggest that caspase-dependent SMC death plays an obligatory role in onset aortic remodeling induced by AT_1 receptor blockade in hypertension.

Materials and Methods

Male SHR (250 to 275 g) purchased from Charles-River (St-Constant, Quebec) were housed for at least 48 hours before initiation of drug treatment. Food and water were administered ad libitum. All animal manipulations were conducted according to institutional guidelines.

Original received May 15, 2002; resubmission received November 6, 2002; revised resubmission received February 25, 2003; accepted February 26, 2003.

From the Departments of Pharmacology (E.-L.M., S.D.S., D.d.B.) and Medicine (P.H.), University of Montreal Hospital (CHUM) Research Center, Montreal, Quebec, Canada.

Correspondence to Denis deBlois, Department of Pharmacology, University of Montreal Hospital (CHUM) Research Center, 3840 St-Urbain St, Rm 7-132B, Montreal, Quebec H2W 1T8, Canada. E-mail [redacted]

© 2003 American Heart Association, Inc.

Circulation Research is available at <http://www.circresaha.org>

DOI: 10.1161/01.RES.0000065619.36118.20

Effects of Losartan Treatment for 6 Days and z-VAD-fmk Cotreatment During the Last 24 Hours on Total SMC Nuclei and Morphometric Quantification in the Aortic Media of SHR

	Control (n=15)	Losartan (n=12)	Losartan+z-VAD-fmk (n=11)
Measurements on cross sections			
Medial cross-sectional area, $\mu\text{m}^2 \times 10^{-4}$	45 \pm 1	40 \pm 3*	46 \pm 1†
Measurements on disectors			
Total volume of disectors, $\mu\text{m}^3 \times 10^{-6}$	112 \pm 9	143 \pm 7*	96 \pm 12†
No. of nuclei in top sections	67 \pm 4	88 \pm 4*	61 \pm 3†
No. of nuclei still present in bottom sections	39 \pm 2	66 \pm 5*	39 \pm 5†
No. of nuclei absent from bottom sections	28 \pm 3	22 \pm 3*	22 \pm 4
Average nuclear width, μm	6 \pm 1	3.2 \pm 0.3*	7 \pm 1†
Cell numerical density, $\mu\text{m}^{-3} \times 10^{-3}$	0.25 \pm 0.01	0.15 \pm 0.01*	0.23 \pm 0.01†
Combined measurements			
No. of cells/ μm of aorta	114 \pm 19	61 \pm 3*	104 \pm 14†
Percent reduction in cell number	...	47*	9†

*Significantly different ($P<0.05$) vs control; †significantly different ($P<0.05$) vs losartan.

Time Course Study

In order to assess the time-course of losartan effects, SHR received losartan (30 mg/kg per day; gift of Merck-Frosst, Montreal, Canada) dissolved in the drinking water for 0, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, or 9.5 days ($n=6$ per group). In the subset of rats killed at day 9.5 of losartan treatment, systolic blood pressure was evaluated by tail-cuff plethysmography, as we described previously,⁸ on each day between days 0 and 7 of treatment.

In order to evaluate vascular DNA synthesis in vivo at 1.5 hour before death, all rats received a single intravenous bolus of [³H]-thymidine (0.5 mCi/kg; New England Nuclear) after induction of anesthesia with a single IM injection of a mixture of ketamine (80 mg/kg; MTC Pharmaceuticals), xylazine (4 mg/kg; Bayer), and acepromazine (2 mg/kg; Ayerst). Death was induced by exsanguination with retrograde perfusion of isotonic saline (200 mL) through the abdominal aorta and draining via the jugular vein. The thoracic aorta was isolated, cleaned of adherent tissue, and a vascular segment between the third and fourth intercostal arteries was fixed in 4% paraformaldehyde for histological studies. The distal segment of the aortic media (between the fourth intercostal arteries and the diaphragm) was denuded of endothelium, snapped frozen and pulverized in liquid nitrogen using a mortar and pestle and stored at -80°C .

Histological Studies

Detailed histological methods are described in the online data supplement.

Determination of Smooth Muscle Cell Number

SMC number per unit length was determined as we previously described using the 3-dimensional disector method, a quantification procedure independent of nucleus orientation, shape, or size.¹⁰ Detailed formulae are described in the online data supplement. Calculations were performed in parallel to evaluate SMC number per unit length for each animal. Final values as well as intermediate values at selected steps of the calculations (averaged for each experimental group) are presented (Table).

Expression of Apoptosis-Regulatory Proteins

The protein levels of the latent caspase-3 fragment (32 kDa), active caspase-3 fragments (17 to 20 kDa), active caspase-9 fragment (38 kDa), as well as Bcl-2 and Bax in the aortic media were examined by immunoblot analysis. The distal segment of the aortic media was pulverized in liquid nitrogen using a mortar and pestle, and an aliquot (25 mg) of the pulverized tissue was lysed in extraction

buffer [10 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl pH 7.5, 1% Triton x-100, 4 mmol \cdot L⁻¹ β -glycerophosphate, 4 mmol \cdot L⁻¹ sodium fluoride, 1 mmol \cdot L⁻¹ EDTA, 1 mmol \cdot L⁻¹ EGTA, 200 $\mu\text{mol} \cdot$ L⁻¹ sodium orthophosphate, 51 $\mu\text{mol} \cdot$ L⁻¹ benzamidine, 0.5 mmol \cdot L⁻¹ phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), 21 $\mu\text{mol} \cdot$ L⁻¹ leupeptin, 5 mmol \cdot L⁻¹ DTT and 1 $\mu\text{mol} \cdot$ L⁻¹ microcystin (Sigma-Aldrich Canada Ltd)]. Protein concentrations were determined with the Bio-Rad Assay (Bio-Rad Laboratories). Equal amounts of proteins (25 μg) separated on 15% SDS-polyacrylamide gel were transferred to Hybond-C extra membrane (Amersham, Bioscience). Membrane were blocked in 5% nonfat milk and incubated with anti-caspase-3 (1:1000 BD Pharmingen), anti-active caspase-9 (1:1000; New England Inc), anti-Bax (1:1000 Santa-Cruz Biotech), or anti-Bcl-2 (1:1000 Santa-Cruz Biotech) followed by incubation with goat anti-mouse or goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated antibody (1:2000 Santa-Cruz Biotech) and then enhancement medium ECL Plus (Life Science Products) according to manufacturer's protocol. Intensity of each band was quantified using NIH Image program 1.61.

Caspase Inhibitor Study

In order to assess the role of caspases in losartan-induced vascular remodeling, male SHR (250 to 275 g) were randomized to treatment with placebo ($n=15$) or losartan (30 mg/kg per day; $n=23$) in the drinking water for 6 days. At 24 hours before death, a subset of losartan-treated animals ($n=12$) was randomly selected for treatment with the caspase inhibitor z-VAD-fmk (cumulative dose: 4.4 mg/kg; Enzyme System Products) given fractionally in three intravenous injections at 24, 16, and 8 hours before death. All other rats received the DMSO vehicle (100 μL per intravenous bolus) according to the same administration schedule (final group size was $n=15$ in placebo group, $n=12$ in losartan group, and $n=11$ in losartan+[z-VAD-fmk] group). Animals were subjected to brief anesthesia with inhalation enflurane, and the right femoral vein was exposed for the intravenous injections.

Tissue isolation procedures were exactly as described above, including [³H]-thymidine administration at 1.5 hours before death by exsanguination in anesthetized animals, and sampling of vascular sections for histological studies. In this study, 25 mg of the frozen aortic media was used as a source of material to examine both synthesis ([³H]-thymidine incorporation) and internucleosomal fragmentation of vascular DNA.

The internucleosomal DNA fragmentation index was quantified as we previously described.⁸ Briefly, after terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-[³²P] nick end labeling of extracted DNA, increasing amounts of DNA (0.05 to 0.4 μg) were fractionated

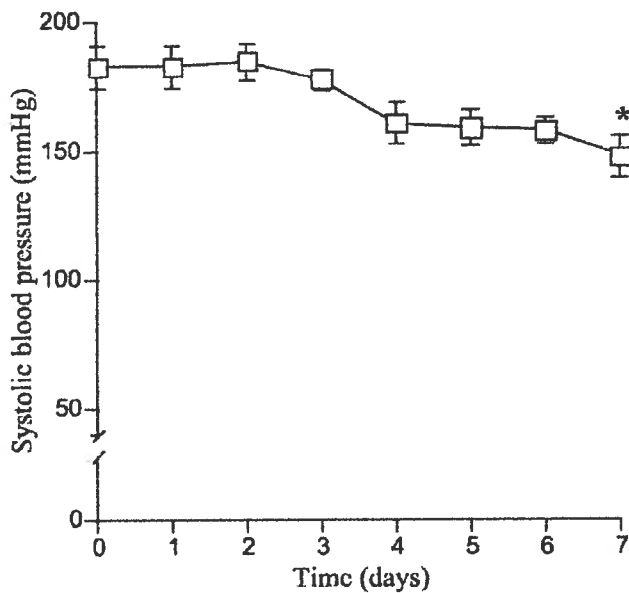


Figure 1. Systolic blood pressure reduction in response to losartan. Graph represents arterial systolic blood pressure of SHR treated with losartan measured by plethysmography over a 7-day period (mean \pm SEM; $n=5$). * $P<0.01$.

by 1.5% agarose gel electrophoresis. Radioactivity associated with small DNA fragments (from 150 to 1500 bps) was evaluated with a PhosphorImager (Molecular Dynamics). An aliquot of the pulverized aortic media (10 mg) from the distal segment of the vessel (between the fourth intercostal arteries and diaphragm) was lysed and DEVDase (caspase-3-like) activity was measured using the fluorogenic substrate Ac-DEVD-AMC (40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) (BioMol Research Labs Inc) in the presence or absence of the caspase-3 inhibitor DEVD-CHO (1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), as we previously described for cultured SMCs.¹¹ Fluorescence was calibrated with AMC (10 to 100 nmol $\cdot \text{L}^{-1}$). Caspase-3-like activity was defined as the DEVD-CHO-sensitive activity.

Statistical Analysis

Values are presented as mean \pm SEM. Results were analyzed using analysis of variance followed by unpaired Student's *t* test with Bonferroni correction for multiple comparisons. A value of $P<0.05$ was considered statistically significant.

An expanded Materials and Methods section can be found in the online data supplement available at <http://www.circresaha.org>.

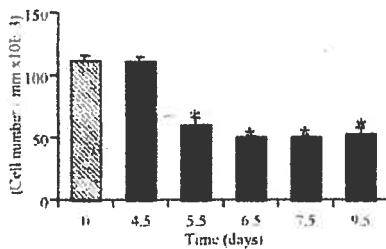
Results

Time Course Study

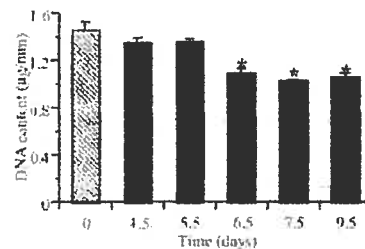
Pretreatment values of body weight were 238 ± 3 g ($n=36$). All rats gained weight during the experiment period but final values of body weight were similar between all groups (not shown). Average pretreatment values of systolic blood pressure were 183 ± 9 mm Hg ($n=6$) in the subset of rats randomly selected for hemodynamic monitoring by tail cuff plethysmography. Systolic blood pressure showed a gradual decrease that reached statistical significance after 7 days of losartan treatment (Figure 1).

As shown in Figure 2, treatment with losartan induced abrupt changes in aortic cellularity and mass. Whereas the aorta showed no change in SMC number or CSA at 4.5 days of treatment, the vessel showed a marked reduction in SMC number (46%) and CSA (8.5%) after an additional 24 hours of treatment (at 5.5 days), as measured between the third and fourth intercostal arteries. Medial CSA was 0.472 ± 0.006 mm² at day 0 and 0.464 ± 0.004 mm² at day 4.5 (NS versus day 0), whereas it was 0.432 ± 0.007 mm² at day 5.5 ($P=0.0007$ versus day 0; $n=6$ per group). No further significant modification of vascular cellularity or mass was observed throughout the rest of the 9.5-day treatment. Total DNA extracted from the distal segment of the thoracic aorta showed a decrease that reached significance at day 6.5 (1.09 ± 0.05 $\mu\text{g}/\text{mm}$) as compared with day 0 (1.464 ± 0.06 $\mu\text{g}/\text{mm}$) with no further reduction up to 9.5 days of treatment (Figure 2C). Overall, the decrease in aortic DNA correlated significantly with the depletion of SMCs ($P=0.001$; $R=0.76$).

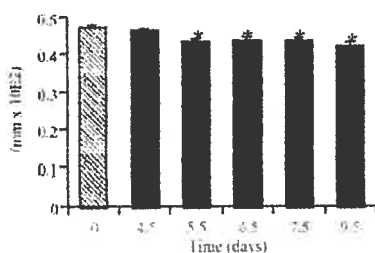
A Aortic smooth muscle cell number



C Aortic DNA content



B Medial mass



D TUNEL-positive SMC

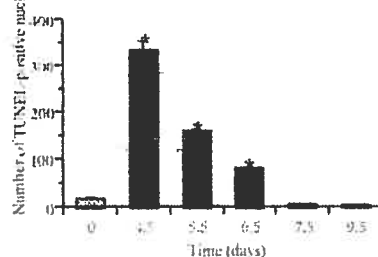


Figure 2. Kinetics of aortic hypertrophy regression in response to losartan. A, Aortic smooth muscle cell number per unit length. B, Medial mass indicative of aortic hypertrophy evaluated by quantitative image analysis of the medial cross-sectional area (CSA). C, Total aortic media content evaluated by DNA extraction and quantification according to normalized aortic mass per length and body mass. D, TUNEL-positive smooth muscle cell number per vascular cross section. Every TUNEL-positive SMC nuclei was counted to express the absolute number of TUNEL-positive nuclei per cross section (containing an average of 1100 SMC nuclei). * $P<0.0083$.

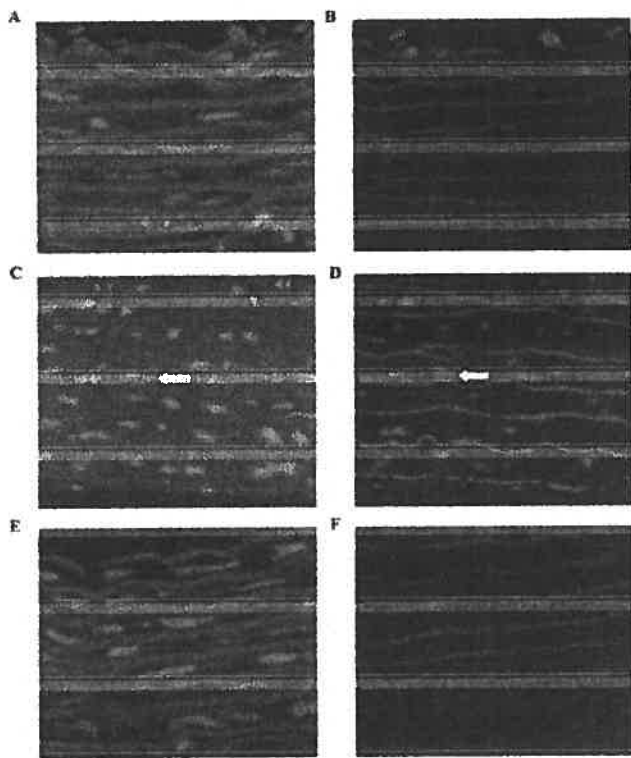


Figure 3. Apoptotic SMC nuclei in the aortic media. SMC apoptosis was examined using the fluorescent TUNEL assay, using a 2-step in situ fluorescent labeling protocol. Total SMC nuclei labeled with propidium iodide at 400 \times at day 0 (A), day 4.5 (C), and day 7.5 (E) of losartan treatment. These same sections examined under a filter for blue excitation/green emission at day 0 (B), day 4.5 (D), and day 7.5 (F) allowed the visualization of TUNEL-positive SMC nuclei indicative of SMC apoptosis as shown by arrow in D.

The time course of aortic SMC depletion suggested transient SMC apoptosis induction, as we previously reported.^{8,9} Consistent with this, the number of TUNEL-positive nuclei in the aortic media was markedly elevated (19-fold) at 4.5 days (Figures 2D

and 3D). At that time, there was not a detectable change in vascular mass or SMC number. The increase in TUNEL-positive SMC nuclei at 4.5 days preceded the reduction of aortic cellularity and hypertrophy by at least 24 hours, and it decreased gradually over the rest of the treatment period (Figures 2D and 3F). Western blot analysis and quantification of caspase-3 cleavage fragments (17 to 20 kDa) in aortic protein extracts suggested a transient increase (5.6-fold at day 4.5) in active caspase-3 as compared with control group (Figure 4A). There was no alteration in procaspase-3 (32 kDa) expression levels (Figure 4A). Likewise, quantification of caspase-9 cleavage fragments (38 kDa) suggested a transient increase (3.8-fold at day 5.5) in active caspase-9 as compared with control group (Figure 4B). The similarities between the kinetics of activation for caspase-3 and -9 and the induction of SMC death in response to losartan suggested a possible role for caspases in this model. Further evidence for the transient induction of SMC apoptosis was provided by the increased levels of proapoptotic protein Bax (>2-fold) at days 4.5 and 5.5 (significant at 5.5 days only; $P=0.007$; Figure 4C) but not thereafter, and by the decreased levels of antiapoptotic protein Bcl-2 (50%) at 4.5 days but not thereafter (Figure 4D). As a result, the Bax to Bcl-2 ratio was significantly increased (>4-fold) at day 4.5.

In summary, antihypertensive treatment with losartan in SHR elicited an abrupt profile of vascular mass regression that was associated temporally with caspase activation and SMC deletion.

Caspase Inhibitor Study

To validate the implication of caspase-dependent cell death in the early phase of vascular hypertrophy regression in this model, the caspase inhibitor z-VAD-fmk was administered to SHR during the last 24 hours of a 6-day losartan-treatment. This schedule of z-VAD-fmk administration was selected based on data obtained using tissue extracts from the distal segment of the thoracic aorta in the time course study, which suggested recruitment of several apoptosis pathways (activa-

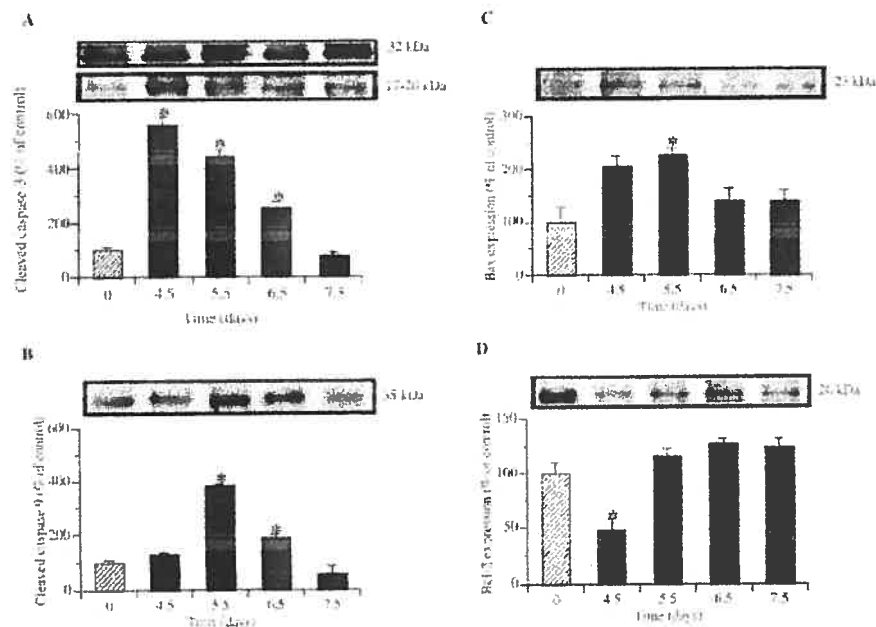


Figure 4. Changes in apoptosis regulatory protein expression induced by losartan. Tissue lysates were immunoblotted and probed with (A) anti-caspase-3 antibody, (B) anti-caspase-9 antibody, (C) anti-Bax antibody, or (D) anti-Bcl-2 antibody. Inset, Representative bands corresponding to the molecular mass of procaspase-3 (32 kDa) and active caspase-3 (17 to 20 kDa), caspase-9 (38 kDa), Bax (23 kDa), and Bcl-2 (26 kDa). Graphs represent (A) caspase-3 activation, (B) caspase-9 activation, (C) Bax expression, or (D) Bcl-2 expression (plotted for each time-point), and data are expressed as percentages considering day-0 of treatment as a 100% value (mean \pm SEM; $n=5$). * $P<0.01$.

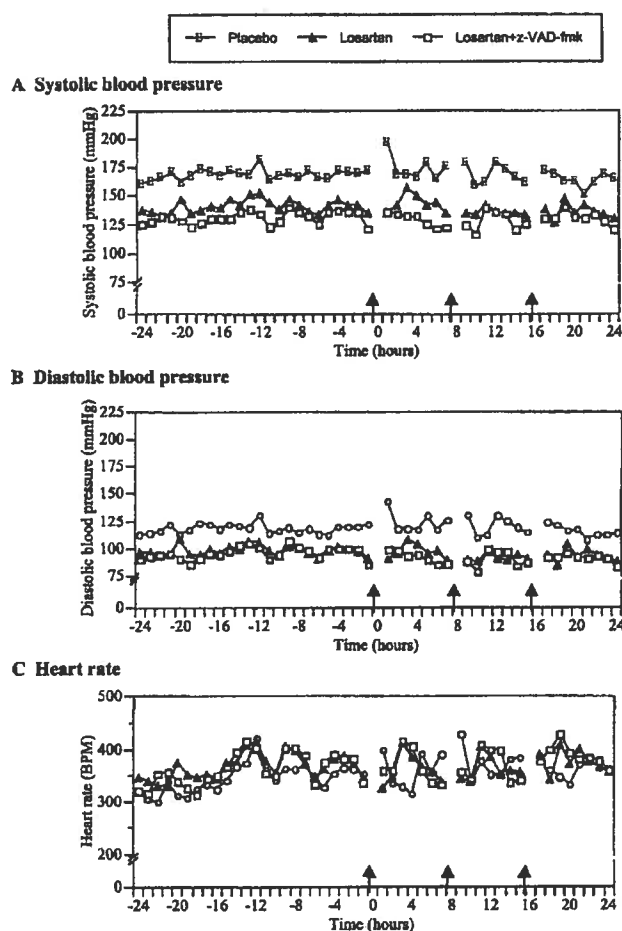


Figure 5. Telemetry monitoring of arterial blood pressure and heart rate during the 24 hours period covering z-VAD-fmk or DMSO administration. A, Systolic arterial pressure. B, Diastolic arterial pressure. C, Heart rate. Three intravenous injections every 8 hours (indicated by the arrows on the graphs) of either z-VAD-fmk or its vehicle DMSO were administered starting at 8:00 AM on day 5 of treatment. Animals were euthanized 24 hours after the first intravenous injection on day 6. Each time point on the graph represents an average of 1-hour readings. Standard error of the mean (not shown) in the control group represented 1.2% to 6.1% of the systolic arterial pressure, 0.8% to 7.9% of the diastolic arterial pressure, and 0.2% to 9.8% of the heart rate. These values did not differ between the control and the treated groups.

tion of caspase-3 and -9, increased Bax levels, and a decrease in DNA content) around day 5.5 of losartan treatment (Figures 2D and 4A through 4C). Subsets of age-matched SHR ($n=3$ per experimental group) were used for hemodynamic monitoring by telemetry during the 24-hour period covering the three intravenous injections of z-VAD-fmk or DMSO vehicle. As shown in Figure 5, systolic blood pressure, diastolic blood pressure, and heart rate showed no significant alteration during this period.

As compared with vehicle, losartan increased internucleosomal DNA fragmentation 2-fold ($P=0.026$), an effect that was attenuated by z-VAD-fmk (Figure 6). The results obtained using a fluorogenic caspase substrate provided additional evidence of increased caspase-3 activity (>3 -fold) in aortic protein extracts after losartan treatment and

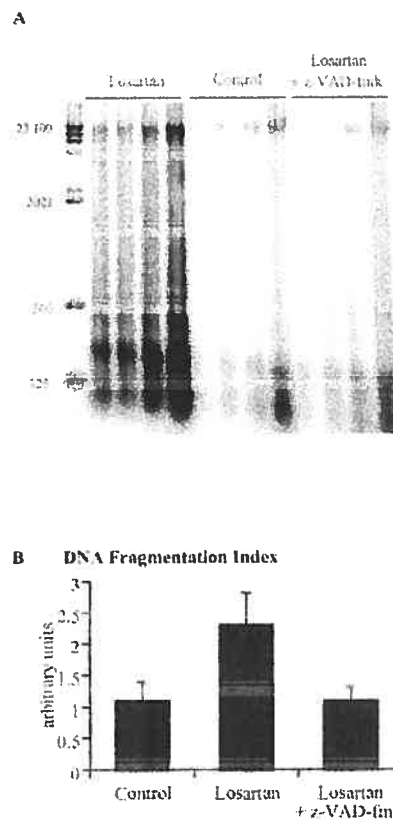


Figure 6. Z-VAD-fmk attenuates losartan-induced internucleosomal DNA fragmentation. A, DNA ladders obtained with DNA extracted from the aorta of SHR treated for 6 days with placebo (Control), Losartan, or Losartan+z-VAD-fmk during the last 24 hours. After terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-[32 P] nick end labeling, increasing amounts of DNA (0.05 to 0.4 μ g) were fractionated by 1.5% agarose gel electrophoresis. B, DNA fragmentation index was obtained after quantification of DNA ladders (mean \pm SEM).

confirmed the effectiveness of z-VAD-fmk as a caspase inhibitor in our in vivo model (Figure 7A). Consistent with the time course data described above, treatment with losartan for 6 days caused a significant reduction in aortic SMC number (47%), medial CSA (11%), and media DNA content (20%) (Figure 7). All these effects of losartan were suppressed by z-VAD-fmk (Figure 7). As a further confirmation that z-VAD-fmk suppressed vascular mass regression, the aorta to body weight ratio showed a significant 16% reduction with losartan (4.1 ± 0.2 mg/mm per $g \times 10^{-3}$; $P=0.007$) as compared with control values (4.9 ± 0.2 mg/mm per $g \times 10^{-3}$), a change that was prevented by z-VAD-fmk (5.0 ± 0.1 mg/mm per $g \times 10^{-3}$; $P=0.0001$). The incorporation of [3 H]-thymidine into aortic DNA was not significantly affected with losartan (93 ± 9 CPM/10 μ g; NS) or by z-VAD-fmk (85 ± 9 CPM/10 μ g; NS), as compared with control values (106 ± 19 CPM/10 μ g).

In summary, a caspase inhibitor prevented the early regression of vascular hypertrophy and hyperplasia induced by losartan without affecting hemodynamic parameters.

Discussion

The present study tested the hypothesis that caspase-dependent cell death plays an obligatory role in the early

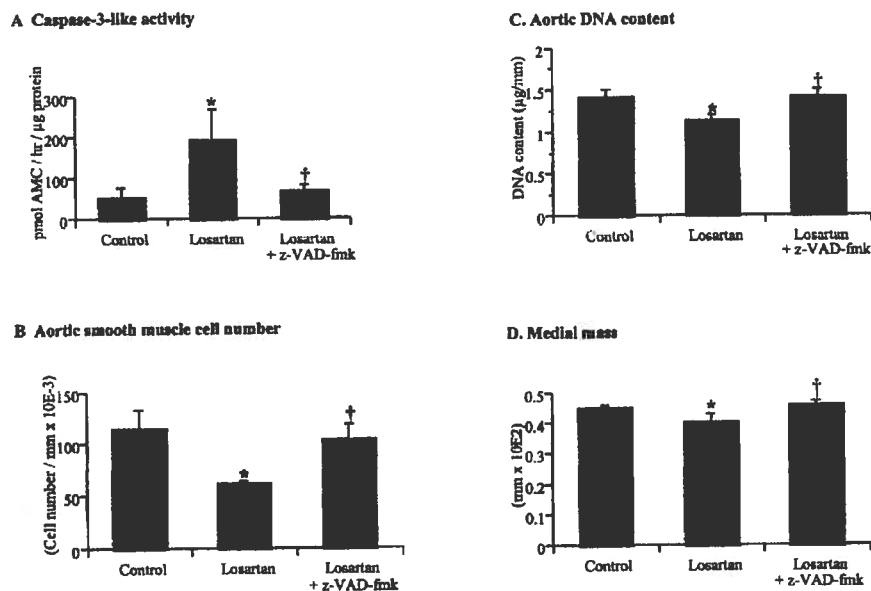


Figure 7. Z-VAD-fmk inhibits losartan-induced regression of aortic hyperplasia and hypertrophy. A, Caspase-3-like DEVDase activity. B, Aortic smooth muscle cell number per unit length of aortic media. C, Total aortic media content evaluated by DNA extraction and quantification according to normalized aortic mass per length and body mass. D, Medial mass evaluated by the cross-sectional area (mean \pm SEM; Control, n=15; Losartan, n=12; Los+z-VAD-fmk, n=11). * $P<0.025$ vs control group; † $P<0.025$ vs losartan group.

phase of vascular remodeling induced by losartan in SHR. The early time courses of vascular apoptosis induction and regression of medial hypertrophy were examined in the aorta of SHR treated with the AT₁ receptor blocker. We found that losartan induced a synchronous wave of SMC apoptosis, as evidenced by a transient increase in Bax to Bcl-2 ratio, caspase-3 and -9 activation profiles, accumulation of TUNEL-positive nuclei, as well as a decrease in SMC number and vascular DNA content between days 4.5 and 6.5 of treatment. Histological analysis showed a close temporal association between SMC number decrease and vascular mass reduction, suggesting that transient SMC apoptosis induction may contribute to the early phase of vascular hypertrophy regression in this model. To test this hypothesis, we gave the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk between days 5 and 6 of losartan treatment, ie, within the period of recruitment of several apoptosis pathways (caspase-3 and -9 and Bax) and decrease in vascular DNA and SMC number. We found that treatment with z-VAD-fmk within this critical period prevented the effects of losartan on aortic remodeling, including increased caspase-3-like enzymatic activity, internucleosomal DNA fragmentation, SMC depletion, vascular DNA reduction, and aortic mass reduction. Taken together, these results suggest that caspase-dependent cell death plays an obligatory role in the early phase of vascular mass regression induced by losartan in this model of hypertension.

SMCs have been shown to act as amateur phagocytes in the presence of apoptotic bodies *in vitro*.¹² In rabbit carotid arteries undergoing remodeling in response to reduction in flow, Cho et al¹³ reported that removal of apoptotic SMCs occurred with a half-life of 1 to 2 hours *in vivo*. However, the estimated frequency of apoptotic SMC in the rabbit arteries (0.13%) was lower than in the present study (approximately 30%). We noted that the magnitude of SMC depletion, assessed histologically, was slightly larger than the significant reduction of total vascular DNA, possibly reflecting incomplete removal of remnant apoptotic bodies in the arterial wall. Consistent with this, we reported that after 4

weeks of losartan treatment in SHR, the decrease in aortic DNA content is comparable (or slightly greater) than the decrease in SMC number.⁸ It may be relevant that SMC nuclear profiles and total DNA content were quantified in different aortic segments (proximal and distal to the heart, respectively). In the early phase of vascular regression, the incidence of SMC apoptosis may be lower or slower to develop at the more distal levels of the thoracic aorta. The formation of polyploid SMC by nuclear fusion may also reduce the number of SMC nuclear profiles. Although it cannot be formally excluded, we consider this possibility unlikely because of the low incidence ($\leq 1\%$) of multinucleated SMC in 3-month-old SHR aorta.¹⁴ Moreover, the enhanced accumulation of polyploid SMC in the untreated SHR aorta¹⁴ is reversed^{15,16} rather than increased by AT₁ receptor antagonists.

In other acute *in vivo* models of apoptosis induction such as in rat ischemic cardiomyocytes, Fas-stimulated mouse hepatocytes, and ischemic mouse neurons, z-VAD-fmk effectively inhibits apoptosis with preservation of functionality in the later two models.⁴⁻⁶ The plasma z-VAD-fmk concentration likely reached in the present study (25 μ mol/L range) is in the lower range of the concentrations used *in vitro* to inhibit caspases.² Moreover, inhibition of ischemic cardiomyocyte apoptosis *in vivo* is dose-dependent in the range of the z-VAD-fmk dose used in the present study.¹⁷

Previous studies suggested that transient induction of SMC apoptosis was a common feature of aortic hypertrophy regression in SHR treated with different classes of antihypertensive drugs, including AT₁ antagonists, angiotensin converting enzyme inhibitors, and dihydropyridine calcium channel blockers.^{8,9} These drugs also induce a transient increase in cardiac apoptosis during regression of cardiac hypertrophy,¹⁸ a response that results in selective reversal of fibroblast hyperplasia in the SHR heart.¹⁹ Evidence suggest that apoptosis is also increased by losartan treatment in small mesenteric arteries of SHR, although with a delayed kinetic of induction.²⁰ Nifedipine treatment increases SMC apoptosis

and reduces SMC number in the carotid artery neointima of SHR and of Wistar-Kyoto rats but not in the underlying media.²¹ The possible role of blood pressure reduction in SMC apoptosis induction during aortic mass regression is worth considering. Arterial unloading and reduction in blood flow can induce SMC apoptosis.^{13,22-24} In vitro studies have established, however, that angiotensin II can modulate SMC apoptosis negatively (via AT₁ receptors^{25,26}) or positively (via AT₂ or AT₁ receptors²⁷) in the absence of hemodynamic influences. In SHR treated with the AT₁ antagonist valsartan, coadministration of the AT₂ antagonist PD123319 prevents both SMC apoptosis and vascular mass regression, although it does not affect blood pressure reduction.⁹ Moreover, treatment with the angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril for one week markedly reduces blood pressure without affecting SMC apoptosis at that time in the SHR aorta.⁸ Likewise, marked reduction of high blood pressure with hydralazine is not associated with vascular apoptosis or remodeling within 4 weeks in SHR.⁸ In the present study, the decline in high blood pressure over the first week of losartan treatment contrasted with the sudden onset and subsequent stabilization of SMC deletion and regression of vascular mass. Collectively, these data suggest that the regulation of SMC apoptosis and early vascular mass regression in this model show a strong pressure-independent component, although a role for hemodynamic factors cannot be formally excluded. It is however important to note that z-VAD-fmk suppressed apoptosis without affecting key hemodynamic parameters in SHR.

The time-dependent changes in apoptosis-related proteins suggest that caspase-3 activation and bcl-2 downregulation acted upstream of Bax and caspase-9. After a death signal, Bax can associate with the mitochondria to induce the release of cytochrome c and formation of the apoptosome complex in association with caspase-9 activation.^{28,29} The signaling pathways responsible for cell death in the present model remain incompletely defined, but evidence suggest a role for AT₂ receptors for angiotensin II.⁹ In recent years, it has become apparent that angiotensin II modulates apoptosis in a cell type- and receptor subtype-dependent manner. Acting via AT₁ receptors, angiotensin II can suppress apoptosis in SMCs but stimulate apoptosis in endothelial cells and cardiomyocytes.^{27,30} AT₂ receptors can however induce apoptosis in SMCs, endothelial cells, cardiomyocytes, and cardiac fibroblasts.^{27,31} AT₂ receptor-dependent apoptosis is associated with Bcl-2 downregulation and executioner caspase-3 activation.^{27,32,33} Other key intracellular pathways implicated in mediating AT₂-dependent apoptosis include de novo ceramide generation and protein phosphatase activation.^{27,33} In vivo, the role of AT₂ receptors is more controversial.³⁴⁻³⁷ With its rapid kinetics, the present in vivo model provides a framework for studying the molecular regulation of AT₂ receptor- and caspase-dependent SMC death during onset vascular remodeling with AT₁ receptor antagonists in hypertension. To our knowledge, this model currently exhibits one of the largest synchronized induction of cell death by apoptosis in vivo. Massive cell death by apoptosis in vivo has been described in pathological conditions such as postangioplasty vascular remodeling^{38,39} and Fas-induced liver degen-

eration in mice.⁶ Considering the current focus on inhibitors of apoptosis as potential therapeutic agents, it is noteworthy that apoptosis may be viewed as therapeutically beneficial in the present model.

Some limitations of the present study should be addressed. First, the relative role of caspase subtypes remains to be determined because z-VAD-fmk is not specific for caspase subtypes. Second, long-term effects of caspase inhibition on SMC survival are unknown. Although apoptosis inhibition with z-VAD-fmk maintains functionality in ischemic hepatocytes, neurons, and cardiomyocytes in vivo, other in vitro studies have shown that apoptosis inhibition may eventually lead to noncaspase-dependent cell death.⁴⁰ Third, nonspecific effects of z-VAD-fmk, for instance on lysosomal cysteine proteases of the cathepsin family, cannot be ruled out.⁴¹ The role of cathepsins in apoptosis is unclear, with studies in nonvascular cells showing stimulation, suppression, or no effect.⁴²⁻⁴⁴ Cathepsin-induced apoptosis may involve a limited caspase-processing activity.⁴⁵ Overall, available evidence suggests that caspases act downstream of cathepsin-mediated apoptosis.^{46,47} Whatever the relationship between caspases and cathepsins, the present conclusion that SMC apoptosis inhibition prevents early vascular mass regression with an AT₁ antagonist is supported by our previous study in SHR cotreated with an AT₂ receptor antagonist.⁹

In summary, the early phase of aortic mass regression in losartan-treated SHR occurred as an acute and rapid event synchronized with a transient increase in Bax to Bcl-2 ratio, caspase-3 activation, and SMC apoptosis. Caspase inhibition with z-VAD-fmk prevented losartan-induced apoptosis and regression of aortic hypertrophy. Together these results demonstrate that caspase-dependent SMC death mediates the early phase of vascular remodeling in response to AT₁ receptor blockade in this rat model of essential hypertension.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-4252 and MT-10803). D.D. is a scholar of the Fonds de la recherche en santé du Québec. E.-L.M. and S.D.S. both hold an award from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC/CIHR).

References

- Samali A, Zhivotovsky B, Jones D, Nagata S, Orrenius S. Apoptosis: cell death defined by caspase activation. *Cell Death Differ.* 1999;6:495-496.
- Ekert PG, Silke J, Vaux DL. Caspase inhibitors. *Cell Death Differ.* 1999;6:1081-1086.
- Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res.* 1998;82:1111-1129.
- Yaoita H, Ogawa K, Machara K, Maruyama Y. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation.* 1998;97:276-281.
- Endres M, Namura S, Shimizu-Sasamata M, Waeber C, Zhang L, Gomez-Isla T, Hyman BT, Moskowitz MA. Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998;18:238-247.
- Rodriguez I, Matsuura K, Ody C, Nagata S, Vassalli P. Systemic injection of a tripeptide inhibits the intracellular activation of CPP32-like proteases in vivo and fully protects mice against Fas-mediated fulminant liver destruction and death. *J Exp Med.* 1996;184:2067-2072.
- Hamet P, deBlois D, Dam T-V, Richard L, Teiger E, Tea B-S, Orlov SN, Tremblay J. Apoptosis and vascular wall remodeling in hypertension. *Can J Physiol Pharmacol.* 1996;74:850-861.

8. deBlois D, Tea B-S, Dam T-V, Tremblay J, Hamet P. Smooth muscle cell apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997;29:340-349.
9. Tea BS, Der Sarkissian S, Touyz RM, Hamet P, deBlois D. Proapoptotic and growth-inhibitory role of angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats in vivo. *Hypertension*. 2000;35:1069-1073.
10. Gundersen HJG, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Miller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1988;96:857-881.
11. Orlov SN, Thorin-Trescases N, Kotchevlev SV, Tremblay J, Hamet P. Involvement of the intracellular Na^+/K^+ ratio blocks apoptosis in vascular smooth muscle at a site upstream of caspase-3. *J Biol Chem*. 1999;274:16545-16552.
12. Bennett MR, Gibson DF, Schwartz SM, Tait JF. Binding and phagocytosis of apoptotic vascular smooth muscle cells is mediated in part by exposure of phosphatidylserine. *Circ Res*. 1995;77:1136-1142.
13. Cho A, Mitchell L, Koopmans D, Langille BL. Effects of changes in blood flow rate on cell death and cell proliferation in carotid arteries of immature rabbits. *Circ Res*. 1997;81:328-337.
14. Owens GK. Differential effects of antihypertensive drug therapy on vascular smooth muscle cell hypertrophy, hyperplasia, and hyperplasia in the spontaneously hypertensive rat. *Circ Res*. 1985;56:525-536.
15. Devlin AM, Gordon JF, Davidson AO, Clark JS, Hamilton CA, Morton JJ, Campbell AM, Reid JL, Dominiczak AF. The effects of perindopril on vascular smooth muscle polyploidy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 1995;13:211-218.
16. Dominiczak AF, Devlin AM, Lee WK, Anderson NH, Bohr DF, Reid JL. Vascular smooth muscle polyploidy and cardiac hypertrophy in genetic hypertension. *Hypertension*. 1996;27:752-759.
17. Weinmann P, Meulemans A, Daou D, Le Guludec D, Yaoitaa H, Ogawa K, Machara K, Maruyama Y. Attenuation of ischemia/reperfusion injury by a caspase inhibitor. *Circulation*. 2000;101:e75.
18. Tea BS, Dam TV, Moreau P, Hamet P, deBlois D. Apoptosis during regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats: temporal regulation and spatial heterogeneity. *Hypertension*. 1999;34:229-235.
19. Der Sarkissian S, Marchand E, Duguay D, Hamet P, deBlois D. Reversal of interstitial fibroblast hyperplasia via apoptosis hypertensive rat heart with valsartan or enalapril. *Cardiovasc Res*. 2003;57:775-783.
20. deBlois D, Moreau P, Tea BS, Tremblay J, Hamet P. Pharmacological regulation of cardiovascular apoptosis in vivo. In: Ruffolo RR, Walsh F, eds. *Apoptosis in Health and Disease*. London, UK: Harwood Academic Publishers; 2000:125-148.
21. Lemay J, Tea BS, Hamet P, deBlois D. Regression of neointimal lesion in the carotid artery of nifedipine-treated SHR and WKY rats: possible role of apoptosis. *J Vasc Res*. 2001;38:462-470.
22. Mattson EJ, Kohler TR, Vergel SM, Clowes AW. Increased blood flow induces regression of intimal hyperplasia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:2245-2249.
23. Courtman DW, Cho A, Langille L, Wilson GJ. Eliminating arterial pulsatile strain by external banding induces medial but not neointimal atrophy and apoptosis in the rabbit. *Am J Pathol*. 1998;153:1723-1729.
24. Bayer IM, Adamson SL, Langille BL. Atrophic remodeling of the artery-cuffed artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1499-1505.
25. Yamada T, Akishita M, Pollman MJ, Gibbons GH, Dzau VJ, Horiuchi M. Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis and antagonizes angiotensin II type 1 receptor action: an in vitro gene transfer study. *Life Sci*. 1998;63:PL289-PL295.
26. Pollman MJ, Yamada T, Horiuchi M, Gibbons GH. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis: countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res*. 1996;79:748-756.
27. Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension*. 1999;33:613-621.
28. Silke J, Vaux DL. Cell death: shadow boxing. *Curr Biol*. 1998;8:R528-R531.
29. Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol*. 1997;139:1281-1292.
30. Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells: protective effect of nitric oxide. *Circ Res*. 1997;81:970-976.
31. Li W, Ye Y, Fu B, Wang J, Yu L, Ichiki T, Inagami T, Ichikawa I, Chen X. Genetic deletion of AT_2 receptor antagonizes angiotensin II-induced apoptosis in fibroblasts of the mouse embryo. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;250:72-76.
32. Miura S, Karnik SS. Ligand-independent signals from angiotensin II type 2 receptor induce apoptosis. *EMBO J*. 2000;19:4026-4035.
33. Nouet I, Nahmias I. Signal transduction from the angiotensin II AT_2 receptor. *Trend Endocrinol Metab*. 2000;11:1-6.
34. Levy BI, Benessiano J, Henrion D, Caputo L, Heymes C, Duriez M, Poitevin P, Samuel JL. Chronic blockade of AT_2 -subtype receptors prevents the effect of angiotensin II on the rat vascular structure. *J Clin Invest*. 1996;98:418-425.
35. Otsuka S, Sugano M, Makino N, Sawada S, Hata T, Niho Y. Interaction of mRNAs for angiotensin II type 1 and type 2 receptors to vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1998;32:467-472.
36. Li JS, Touyz RM, Schiffrin EL. Effects of AT_1 and AT_2 angiotensin receptor antagonists in angiotensin II-infused rats. *Hypertension*. 1998;31:487-492.
37. Opie LH, Sack MN. Enhanced angiotensin II activity in heart failure: reevaluation of the counterregulatory hypothesis of receptor subtypes. *Circ Res*. 2001;88:654-658.
38. Perlman H, Maillard L, Krasinski K, Walsh K. Evidence for the rapid onset of apoptosis in medial smooth muscle cells after balloon injury. *Circulation*. 1997;95:981-987.
39. Pollman MJ, Hall JL, Gibbons GH. Determinants of vascular smooth muscle cell apoptosis after balloon angioplasty injury: influence of redox state and cell phenotype. *Circ Res*. 1999;84:113-121.
40. Lemaire C, Andreau K, Souvannavong V, Adam A. Inhibition of caspase activity induces a switch from apoptosis to necrosis. *FEBS Lett*. 1998;425:266-270.
41. Schotte P, Declercq W, Van Huffel S, Vandenabeele P, Beyaert R. Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases. *FEBS Lett*. 1999;442:117-121.
42. van Eijk M, de Groot C. Germinal center B cell apoptosis requires both caspase and cathepsin activity. *J Immunol*. 1999;163:2478-2482.
43. Isahara K, Ohsawa Y, Kanamori S, Shibata M, Waguri S, Sato N, Gotow T, Watanabe T, Momoi T, Urase K, Kominami E, Uchiyama Y. Regulation of a novel pathway for cell death by lysosomal aspartic and cysteine proteinases. *Neuroscience*. 1999;91:233-249.
44. Gottfron FJ, Ying HS, Choi DW. Caspase inhibition selectively reduces the apoptotic component of oxygen-glucose deprivation-induced cortical neuronal cell death. *Mol Cell Neurosci*. 1997;9:159-169.
45. Vancompernelle K, Van Herreweghe F, Pynaert G, Van de Craen M, De Vos K, Totty N, Sterling A, Fiers W, Vandenabeele P, Grooten J. Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity. *FEBS Lett*. 1998;438:150-158.
46. Roberg K, Kagedal K, Ollinger K. Microinjection of cathepsin d induces caspase-dependent apoptosis in fibroblasts. *Am J Pathol*. 2002;161:89-96.
47. Nakayama M, Ishidoh K, Kayagaki N, Kojima Y, Yamaguchi N, Nakano H, Kominami E, Okumura K, Yagita H. Multiple pathways of TWEAK-induced cell death. *J Immunol*. 2002;168:734-743.

LISTE DE PUBLICATIONS

Manuscrits (révisés par comités de pairs)

Publiés / acceptés

1. **Der Sarkissian S.**, Marchand E-L., Duguay D., Hamet P., deBlois D. Reversal of interstitial fibroblast hyperplasia via apoptosis in hypertensive rat heart with valsartan or enalapril.
Cardiovascular Research 2003; 57(3): 775-83.
2. Marchand E-L., **Der Sarkissian S.**, Hamet P., deBlois D. Caspase-dependent cell death mediates the early phase of aortic hypertrophy regression in losartan-treated spontaneously hypertensive rats.
Circulation Research 2003; 92:777-784
3. Pchejetski D., Taurin S., **Der Sarkissian S.**, Lopina OD., Pshezhetsky AV., Tremblay J., deBlois D., Hamet P., Orlov SND. Inhibition of Na(+),K(+)-ATPase by ouabain triggers epithelial cell death independently of inversion of the [Na(+)](i)/[K(+)](i) ratio.
Biochemical and Biophysical Research Communications 2003; 301: 735-44.
4. Orlov S.N., Pchejetski D., **Der Sarkissian S.**, Adrarichev V., Taurin S., Farhat N., Pshezhetsky A.V., Tremblay J., Maximov G.V., deBlois D., Bennett M.R., Hamet P. ³[H]-thymidine labelling of DNA triggers apoptosis potentiated by E1A-adenoviral protein.
Apoptosis 2003; 8: 199-208.
5. J. Tremblay, H. Chen, J. Peng, J. Kunes, M.D. Vu, **S. Der Sarkissian**, D. deBlois, A.E. Bolton, L. Gaboury, V. Marshansky, E. Gouadon, P. Hamet. Renal ischemia/reperfusion injury in the rat prevented by a novel immune modulation therapy.
Transplantation. 2002 Nov 27;74(10):1425-33.
6. Chen L-Q., Hu C-Y., **Der Sarkissian S.**, Ferraro P., Pera P., deBlois D., Gaboury L., Duranceau A.C. Apoptosis in Barrett's Esophagus following antireflux surgery.
The British Journal of Surgery 2002;89:1444-1449.
7. Tea B-S., **Der Sarkissian S.**, Touyz R.M., Hamet P., deBlois D. Proapoptotic and growth inhibitory role of angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells of spontaneous hypertensive rats in vivo.
Hypertension. 2000;35:1069-1073.

Soumis / en révision

1. Duguay D., **Der Sarkissian S.**, deBlois D. Evidence that kinin B2 receptor is involved in enalapril-induced vascular apoptosis and regression of hypertrophy in spontaneously hypertensive rats.
(The British Journal of Pharmacology)
2. Marchand E-L., **Der Sarkissian S.**, deBlois D. Caspase inhibition blocks the early phase of left ventricular hypertrophy regression in SHR treated with losartan.
(Journal of Molecular and Cellular Cardiology)
3. **Der Sarkissian S.**, Marchand E-L., Duguay D., deBlois D. Synergistic interaction between enalapril, L-arginine and tetrahydrobiopterin in smooth muscle cell apoptosis and aortic remodeling induction in SHR.
(The British Journal of Pharmacology)
4. **Der Sarkissian S.**, Tea B-S., Marchand E-L., Touyz R.M., deBlois D. Role of angiotensin II type 2 receptors during regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats.
(Hypertension)

En préparation

1. Reeves I., **Der Sarkissian S.**, Jasmin G., Brazeau P., deBlois D. Angiogenic effect of growth hormone releasing factor upon myocardial infarction in the rat.
(*en préparation pour* Endocrinology)

Abrégés

Publiés (* présentations invitées)

1. **Der Sarkissian S.**, Marchand E-L., Hamet P., deBlois D. Activation des caspases dans les non-myocytes lors de la régression de l'hypertrophie cardiaque chez le SHR traité au losartan.
Congrès annuel des stagiaires de recherche de la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal, Montréal, QC (Canada), janvier 2003. Médecine/ Sciences 2003 19 (suppl.2): P-92, 18.
2. Marchand E-L., **Der Sarkissian S.**, Hamet P., deBlois D. Implication de la voie des MAPK dans l'apoptose des cellules de muscle lisse au cours de la régression de l'hypertrophie aortique chez le SHR traité au losartan.
Congrès annuel des stagiaires de recherche de la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal, Montréal, QC (Canada), janvier 2003. Médecine/ Sciences 2003 19 (suppl.2): P-221, 40.

3. Duguay D., **Der Sarkissian S.**, deBlois D. L'énalapril renverse l'hyperplasie aortique chez le rat spontanément hypertendu (SHR) indépendamment du récepteur B2 des kinines.
Congrès annuel des stagiaires de recherche de la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal, Montréal, QC (Canada), janvier 2003. Médecine/ Sciences 2003 19 (suppl.2): P-111, 21.
4. **Der Sarkissian S.**, Marchand E-L., Hamet P., deBlois D. Activation sélective des caspases dans les fibroblastes au cours de la régression de l'hypertrophie cardiaque chez les SHR traités au losartan.
11^{ème} réunion scientifique annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle, Québec, QC (Canada), janvier 2003. Médecine/ Sciences 2003 19 (suppl.1): 19.
5. Marchand E-L., **Der Sarkissian S.**, Hamet P., deBlois D. Implication de la voie des MAPK dans l'apoptose des cellules de muscle lisse au cours de la phase précoce de la régression de l'hypertrophie aortique en réponse au losartan.
11^{ème} réunion scientifique annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle, Québec, QC (Canada), janvier 2003. Médecine/ Sciences 2003 19 (suppl.1): 23.
6. Duguay D., **Der Sarkissian S.**, deBlois D. L'énalapril renverse l'hyperplasie aortique chez le rat spontanément hypertendu (SHR) indépendamment du récepteur B2 des kinines.
11^{ème} réunion scientifique annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle, Québec, QC (Canada), janvier 2003. Médecine/ Sciences 2003 19 (suppl.1): 20.
7. Pchejetski D., Taurin S., **Der Sarkissian S.**, deBlois D., Pshezhetsky A.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N.. Dualité de l'effet de la ouabaine sur l'activation de la caspase-3 et sur la survie des cellules endothéliales.
11^{ème} réunion scientifique annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle, Québec, QC (Canada), janvier 2003. Médecine/ Sciences 2003 19 (suppl.1): 23.
8. **Der Sarkissian S.**, Marchand E-L., Duguay D., deBlois D. Synergy between enalapril and nitric oxide enhancing therapy in the reduction of SMC hyperplasia by apoptosis in hypertension
23rd annual Meeting of the Canadian hypertension Society, Edmonton, AB (Canada), octobre 2002. Can J Cardiol 2002; 28 (Suppl B): 179B.
9. Marchand E-L., **Der Sarkissian S.**, Hamet P., deBlois D. Differential activation kinetics of caspase subtypes during smooth muscle cell apoptosis in losartan-treated SHR.
23rd annual Meeting of the Canadian hypertension Society, Edmonton, AB (Canada), octobre 2002. Can J Cardiol 2002; 28 (Suppl B): 177B.
10. Pchejetski D., **Der Sarkissian S.**, deBlois D., Grygorczyk R., Pshezhetski A., Hamet P., Orlov S.N., Inhibition of NA/K pump in renal MDCK cells induces combined activation of apoptosis and necrosis

23rd annual Meeting of the Canadian hypertension Society, Edmonton, AB (Canada), octobre 2002. Can J Cardiol 2002; 28 (Suppl B): 178B.

11. ***Der Sarkissian S.**, Marchand E-L., Duguay D., Hamet P., deBlois D. Renversement de l'hyperplasie vasculaire dans l'hypertension: synergie entre l'enalapril et une thérapie stimulant le NO.
44^{ième} réunion annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec, St-Sauveur, QC (Canada), septembre 2002. Médecine/ Sciences 2002 18 (suppl.2): P-25, 104.
12. Marchand E-L., **Der Sarkissian S.**, Hamet P., deBlois D. Cinétique d'activation des caspases au cours de l'apoptose des cellules du muscle lisse aortiques en réponse au losartan dans un modèle génétique d'hypertension artérielle.
44^{ième} réunion annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec, St-Sauveur, QC (Canada), septembre 2002. Médecine/ Sciences 2002 18 (suppl.2): P-20, 76.
13. ***Der Sarkissian S.**, Marchand E-L., Duguay D., Hamet P., deBlois D. Synergistic interaction between enalapril and nitric oxide enhancing therapy in the reduction of SMC hyperplasia by apoptosis in hypertension.
19th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Prague, (Rép Tchèque), juin 2002. Journal of Hypertension 2002 20 (suppl.4): O124.
14. Marchand E-L., **Der Sarkissian S.**, Hamet P., deBlois D. Differential activation kinetics of caspase subtypes during smooth muscle cell apoptosis in losartan-treated hypertensive rats.
19th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Prague, (Rép Tchèque), juin 2002. Journal of Hypertension 2002 20 (suppl.4): P0092.
15. **Der Sarkissian S.**, Marchand E-L., Duguay D., Hamet P., deBlois D. Renversement de l'hyperplasie vasculaire dans l'hypertension: synergie entre l'enalapril et une thérapie stimulant la production de NO.
10^{ième} réunion scientifique annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle, Québec, QC (Canada), janvier 2003. Médecine/Sciences 2002; 18 (suppl.1) :S18b.
16. **Der Sarkissian S.**, Hamet P., deBlois D. L'inhibition de la voie de l'angiotensine induit l'apoptose des cellules mésothéliales de l'épicarde.
10^{ième} réunion scientifique annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle, Québec, QC (Canada), janvier 2003. Médecine/ Sciences 2002; 18 (suppl.1) :S18a.
17. Marchand E-L., **Der Sarkissian S.**, Hamet P., deBlois D. L'apoptose au cours de la régression de l'hypertrophie vasculaire: un événement subit et transitoire dissocié de la diminution progressive de la pression artérielle en réponse au losartan.
10^{ième} réunion scientifique annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle, Québec, QC (Canada), janvier 2003. Médecine/ Sciences 2002; 18 (suppl.1) :S21.
18. Duguay D., **Der Sarkissian S.**, Marchand E-L., deBlois D. Cinétique de l'apoptose cardiovasculaire induite par l'enalapril chez le rat spontanément hypertendu (SHR).

10^{ième} réunion scientifique annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle, Québec, QC (Canada), janvier 2003. Médecine/Sciences 2002; 18 (suppl.1) :S19.

19. Marchand E-L., **Der Sarkissian S.**, Hamet P., deBlois D. SMC Apoptosis :a sudden, transient and caspase-dependent event mediating aortic hypertrophy regression in losartan-treated hypertensive rats.
AHA Scientific Sessions, Anaheim, Ca (É-U) novembre 2001. Circulation 2001; 104 (17): 1429.
20. ***Der Sarkissian S.**, Hamet P., deBlois D. An AT2 receptor antagonist prevents valsartan induced epicardial mesothelial cell apoptosis.
22nd annual Meeting of the Canadian hypertension Society, Halifax, N-É (Canada), octobre 2001. Can J Cardiol 2001; 17 (Suppl C); 112C.
21. Marchand E-L., **Der Sarkissian S.**, Hamet P., deBlois D. SMC apoptosis during aortic hypertrophy regression is a sudden and transient event in SHR treated with losartan.
22nd annual Meeting of the Canadian hypertension Society, Halifax, N-É (Canada), octobre 2001. Can J Cardiol 2001; 17 (Suppl C): 93C.
22. **Der Sarkissian S.**, Marchand E-L., Hamet P., deBlois D. An AT2 receptor antagonist prevents valsartan induced mesothelial cell apoptosis in the epicardium.
55th Annual Fall Conference and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research, Chicago, Il (É-U), septembre 2001. Hypertension 2001; 38 (3) : P530.
23. Marchand E-L., **Der Sarkissian S.**, Hamet P., deBlois D. SMC apoptosis : a sudden and transient event dissociated from progressive blood pressure reduction in losartan-treated SHR.
55th Annual Fall Conference and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research, Chicago, Il (É-U), septembre 2001. Hypertension 38 (3) : P515.
24. **Der Sarkissian S.**, Hamet P., deBlois D. Angiotensin II blockade induces mesothelial cell apoptosis in the epicardium.
17th World Congress of the International Society of Heart Research, Winnipeg, MB (Canada), juillet 2001. J Mol Cell Cardiol 2001; 33 (6): A105.
25. Marchand E-L., **Der Sarkissian S.**, Hamet P., deBlois D. Caspase-dependent cell death of non-cardiomyocytes in losartan-treated SHR.
17th World Congress of the International Society of Heart Research, Winnipeg, MB (Canada), juillet 2001. J Mol Cell Cardiol 2001; 33 (6): A73.
26. **Der Sarkissian S.**, Hamet P., deBlois D. La thérapie antihypertensive induit sélectivement l'apoptose des non-cardiomyocytes dans le coeur de SHR.
9^{ième} réunion scientifique annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle, Québec, QC (Canada), janvier 2001. Médecine/Sciences 2001; 17 (suppl.1) : S16.

27. Marchand E-L., **Der Sarkissian S.**, deBlois D. Implication des caspases dans la mort des non-cardiomyocytes chez les rats spontanément hypertendus traités au losartan.
9^{ème} réunion scientifique annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle, Québec, QC (Canada), janvier 2001. Médecine/Sciences 2001; 17 (suppl.1) : S19.
28. ***Der Sarkissian S.**, Hamet P., deBlois D. Cell number reduction following apoptosis induction is selective for non-cardiomyocytes in the SHR heart with valsartan or enalapril.
21st annual Meeting of the Canadian hypertension Society, Vancouver, CB (Canada), octobre 2000. Can J Cardiol 2000; 16 (suppl .F) :91F.
29. deBlois D., **Der Sarkissian S.**, Tea B-S., Hamet P. Caspase-3 activation and selective induction by valsartan in spontaneously hypertensive rats.
3rd International Symposium on Angiotensin II Antagonism, London (Angleterre), février 2000. Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System 2000; V 1, (I 1, P 60) :5B.4.
30. **Der Sarkissian S.**, Tea B-S., Hamet P., deBlois D. Le valsartan et l'énalapril stimulent sélectivement l'apoptose des non-cardiomyocytes dans le cœur de SHR en régression.
8^{ème} réunion scientifique annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle, Montréal, QC (Canada), janvier 2000. Médecine/Sciences 2000; 16 (suppl.1) S23.
31. ***Der Sarkissian S.**, Tea B-S., Hamet P., deBlois D. An AT₂ receptor antagonist prevents the anti-proliferative and pro-apoptotic effects of valsartan in non-cardiomyocytes in the SHR heart.
20th annual Meeting of the Canadian Hypertension Society, Québec, QC (Canada), octobre 1999. Can J Cardiol 1999; 15 (suppl.D); 213D.
32. **Der Sarkissian S.**, Tea B-S., Hamet P., deBlois D. Un antagoniste du récepteur AT₂ prévient l'effet anti-prolifératif et pro-apoptotique du valsartan dans les non-cardiomyocytes du cœur chez le SHR.
41^{ème} réunion annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec, Montebello, QC (Canada), octobre 1999. Médecine/Sciences 1999; 15 (suppl.2) P063.
33. Tea B-S., **Der Sarkissian S.**, Hamet P., deBlois D. Les récepteurs AT₂ de l'angiotensine induisent l'apoptose et inhibent la prolifération des cellules musculaires lisses in vivo chez le SHR.
7^{ème} réunion scientifique annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle, Montréal, QC (Canada), janvier 1999. Médecine/Sciences 1999; 15 (suppl .1) 22.
34. deBlois D., Tea B-S., **Der Sarkissian S.**, Hamet P. Croissance et apoptose cardiovasculaire in vivo: Récepteurs AT₁ et AT₂ de l'angiotensine II.
40^{ème} réunion annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec, Mont-Tremblant, QC (Canada), octobre 1998. Médecine/Sciences 1998; 14 (suppl.2) : 32.

35. Tea B-S., **Der Sarkissian S.**, Hamet P., deBlois D. Apoptotic and antiproliferative role of angiotensin II receptor subtype 2 in vascular smooth muscle cells of spontaneous hypertensive rats *in vivo*.
19th annual Meeting of the Canadian Hypertension Society, Ottawa, ON (Canada), octobre 1998. Can J Cardiol 1998; 14 (suppl.F) : 185F.

